

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL GINANE BARRETO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Fusarium* spp. DO FEIJÃO
FAVA E CONTROLE BIOLÓGICO VIA SEMENTES-PLÂNTULAS**

AREIA

2018

GABRIEL GINANE BARRETO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Fusarium* spp. DO FEIJÃO
FAVA E CONTROLE BIOLÓGICO VIA SEMENTES-PLÂNTULAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
da Paraíba como requisito parcial
para a obtenção do título de
Licenciado em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento

AREIA

2018

**Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia-PB**

B273c Barreto, Gabriel Ginane.

Caracterização morfológica de *Fusarium* spp. do
feijão fava e controle biológico via sementes-
plântulas /

Gabriel Ginane Barreto. - Areia, 2018.
66 f.

Orientação: Luciana Cordeiro do
Nascimento. Monografia (Graduação) -
UFPB/CCA.

1. Caracterização de *Fusarium*. 2. Controle Biológico.
3. Feijão fava. 4. *Trichoderma*. 5. Antagonismo. 6.
Fisiologia de plântulas. 7. Promoção de crescimento.
I. Cordeiro do Nascimento, Luciana. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

GABRIEL GINANE BARRETO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Fusarium* spp. DO FEIJÃO
FAVA E CONTROLE BIOLÓGICO VIA SEMENTES-PLÂNTULAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
da Paraíba como requisito parcial
para a obtenção do título de
Licenciado em Ciências
Biológicas.

Aprovado em 09/ Julho / 2018

BANCA EXAMINADORA

Luciana Cordeiro do Nascimento
Prof. Dra. Luciana Cordeiro Nascimento – Orientadora
DFCA/CCA/UFPB

Loise Araújo Costa
Prof. Dra. Loise de Araújo Costa – Examinadora
DCB/CCA/UFPB

Rommel dos Santos Siqueira Gomes
Msc. Rommel dos Santos Siqueira Gomes – Examinador
DFCA/CCA/UFPB

Aos meus pais, Nedja Ginane Barreto e
Gutemberg Barreto, que me incentivaram em
todos estes anos em busca do conhecimento e
formação cidadã,

Aos meus avós, Sylvia da Costa Barreto e
Francisco Haroldo Barreto, que sempre
acreditaram no meu esforço como estudante,

Ao meu irmão Matheus Ginane Barreto, à
minha amada Bárbara Gomes Alves e aos
meus amigos e familiares, pelo apoio moral,

DEDICO.

À todos que ainda acreditam na pesquisa e educação neste País,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço todo apoio recebido pela minha orientadora Luciana Cordeiro do Nascimento, por sua colaboração, paciência, dedicação e ensinamentos que levarei para toda a vida, que foram essenciais na minha vida como estudante.

À Universidade Federal da Paraíba, por meio do Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais, pela oportunidade de estágio no laboratório de Fitopatologia, que me propiciou o anseio pela pesquisa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao amigo Breno Oliveira que já não está mais entre nós, pelas colaborações, amizade e acima de tudo pelos conselhos que levarei para a vida.

Ao professor Ricardo Barbosa de Lucena do Laboratório de Histopatologia Veterinária e Telma, que com paciência e disponibilidade contribuíram na execução deste trabalho.

Ao professor Ricardo Romão Guerra e Edijânio, do Laboratório de Histologia Veterinária, pela disponibilidade e contribuição do espaço para o estudo.

À professora Loíse Araújo Costa pelos conselhos e orientações no decorrer da pesquisa.

À Rommel dos Santos Siqueira Gomes e Mirelly Miguel Porcino pelos conselhos e colaboração, que possibilitaram o desenvolvimento da pesquisa.

À Edcarlos Camilo, pela grande ajuda e colaboração na estatística do trabalho.

À Givanildo Zildo da Silva, que mesmo à distância me presenteou com uma grande amizade nesses últimos anos.

Aos meus amigos Laertty, Rachel, Monique, Erika e Isabela, que me presentearam com uma grande amizade e conselhos, nestes quatro anos de convivência.

À minha namorada Bárbara Gomes, que com seu carinho e paciência me acalmou nesses dias de tensão.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia, nestes três anos de convivência.

À Dona Francisca Souto e Senhor José Thomas pelas colaborações, conversas e brincadeiras nas horas vagas.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente neste caminhada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultura pareada *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp, aos sete e treze dias de cultivo (AREIA-PB, 2018).

Figura 2. Controle biológico de sementes colonizadas por *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp.

Figura 3. Plantas de feijão fava ao vigésimo primeiro dia após inoculação com *Trichoderma* e *Fusarium* spp. A, C) Necrose desenvolvendo-se na raiz primária (indicada por seta); B, D) Escurecimento vascular observado após o corte de feixe vascular (indicado por seta).

Figura 4. Controle biológico com *Trichoderma* em sementes de feijão fava ‘Orelha de Vó’. Índice de velocidade de germinação (IVG), primeira contagem de germinação (PCG) e germinação (GE), porcentagem de plântulas de feijão fava ‘Orelha de Vó’ emergidas na primeira contagem (PCE), emergência (EM) e índice de velocidade de emergência (IVE), sob suspensão em diferentes concentrações de *Trichoderma*.

Figura 5. Comprimento (cm) da parte aérea, raiz primária e plântula de feijão fava ‘Orelha de Vó’, massa seca (g) da parte aérea, raiz e plântula de feijão fava, tratadas sob diferentes suspensões de *Trichoderma*.

Figura 6. Porcentagem de sementes duras (SD) germinadas, porém não emergidas quando submetidas à diferentes concentrações de *Trichoderma*.

Figura 7. Colônias de *Fusarium* spp. em meio batata-dextrose-ágar. Cada par do verso e reverso das placas estão dispostos alinhados em colunas.

Figura 8. Características morfológicas de *Fusarium* spp. do feijão fava em meio SNA. A) micrônídios produzidos sobre falsas cabeças e formando cadeias longas >15 conídios (aumento de 20x); B) esporodóquio produzindo macroconídios (aumento de 40x); C) monofiálides produzindo microconídio em falsa cabeça (aumento de 40x); D) polifiálides (indicado pela seta central) produzindo microconídios em massa sobre falsas cabeças (aumento de 40x); E) macroconídios sendo produzidos; F) polifiálides produzindo microconídios; G) monofiálide produzindo microconídios em cadeia e em massa sobre falsas cabeças (aumento de 40x).

Figura 9. Tipos de clamidósporos dos isolados de *Fusarium* spp. do feijão fava em SNA à partir do vigésimo primeiro dia de cultivo. A) Clamidósporo em cadeia produzido na extremidade da hifa (aumento de 40x); B) Clamidósporo intercalado a hifa (coloração à partir

de azul de metileno, aumento de 100x); C) Clamidósporo duplo (coloração à partir de azul de metileno, aumento de 100x).

Figura 10. Morfologia de microconídios observadas nos isolados de *Fusarium* spp. (aumento de 40x); A) Microconídio oval; B) Microconídio piriforme; C, F) Microconídio globoso; D) Microconídio clavado; E) Microconídio obovoide.

Figura 11. Hifa estéril espiralada observada nos isolados de *Fusarium* spp. (coloração à partir de azul de metileno, aumento de 100x).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de notas aplicada ao crescimento do antagonista e patógeno perante ao teste de cultura pareada.

Tabela 2. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de *Fusarium* spp. submetido ao controle biológico com *Trichoderma in vitro*. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças dentro de cada isolado e maiúsculas, diferenças entre cada isolado e tratamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). UFPB, Areia, PB, 2018.

Tabela 3. Níveis de esporulação dos isolados de *Fusarium* spp., frente ao método de pareamento de culturas com *Trichoderma*.

Tabela 4. Variáveis de comprimento de parte aérea, raiz, comprimento total de plântula, velocidade de emergência (IVE), porcentagem de emergência (PCE) e emergência (EM), expressas em porcentagem (%) de plantas de feijão fava submetidas ao Controle Biológico com *Trichoderma* (AREIA-PB, 2018).

Tabela 5. Incidência de fitopatógenos associados à sementes de feijão fava ‘Orelha de Vó’ para os lotes analisados de Remígio-PB, Alagoa Grande-PB e Campina Grande-PB.

Tabela 6. Características morfológicas(μm) de isolados de *Fusarium*. UFPB, Areia, PB, 2018.

Tabela 7. Marcadores morfológicos diferenciais de *Fusarium* spp., isolados de sementes de feijão fava. UFPB, Areia, PB, 2018.

Tabela 8. Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação (UFC 1×10^4) e pigmentação das colônias em meio BDA para os isolados analisados. UFPB, Areia, PB, 2018.

RESUMO

O manejo de doenças de plantas deve levar em consideração a etiologia do agente causal para a seleção de práticas adequadas. Atualmente, a principal forma de controle de patógenos em plantas é através do controle químico, causando preocupação, oferecendo riscos de saúde do homem e o meio ambiente. Portanto, o objetivo do trabalho é de identificar as interações biológicas entre antagonista e patógeno, bem como desenvolver estratégias eficazes para controle da podridão e murcha-de-fusarium na cultura do feijão fava. Foram selecionados dois isolados de *Trichoderma* spp. derivados da Coleção Micológica do LAFIT, e dez isolados de *Fusarium* spp. oriundos de sementes de feijão fava. As sementes de feijão fava foram obtidas em áreas de cultivo, nos municípios de Remígio, Alagoa Grande e Campina Grande, do estado da Paraíba. Foram realizados testes *in vitro* de confronto direto e compostos voláteis entre o antagonista e o patógeno. Todos os isolados apresentaram antagonismo *in vitro* contra o patógeno. Tendo em vista as características de promotor de crescimento do *Trichoderma*, para a avaliação da qualidade fisiológica, nas concentrações de 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 x 10⁸ conídios/ml⁻¹ do antagonista ao analisar a interferência na germinação e vigor das sementes de feijão fava. O isolado Trichodel® apresentou os maiores comprimentos de plântulas normais. Após a inoculação, foi possível observar sintomas de necrose na raiz primária e escurecimento vascular aos 21 dias. Para a caracterização, um total de 10 isolados foram descritos morfológicamente nos meios BDA e SNA, apresentando uma ampla variabilidade morfológica.

Palavras chave: Antagonismo, Caracterização morfológica, Fisiologia de plântulas, Promoção de crescimento.

ABSTRACT

The management of plant diseases should take into account the etiology of the causal agent for the selection of appropriate practices. Currently, the main form of pathogen control in plants is through chemical control, causing concern, offering human health risks and the environment. Therefore, the objective of the work is to identify the biological interactions between antagonist and pathogen, as well as to develop effective strategies for control of rot and fusarium wilt in bean culture. Two isolates of *Trichoderma* spp. derived from the Mycological Collection of LAFIT, and ten isolates of *Fusarium* spp. seeds of bean. Bean seeds obtained from cultivated areas in the municipalities of Remígio, Alagoa Grande and Campina Grande, in the state of Paraíba. *In vitro* tests of direct comparison and volatile compounds between the antagonist and the pathogen were carried out. All isolates showed antagonism *in vitro* against the pathogen. Considering the growth promoter characteristics of *Trichoderma*, for the evaluation of the physiological quality, in the concentrations of 1,5; 2,0; 2,5 and 3.0×10^8 conidia / ml⁻¹ of the antagonist when analyzing the interference in the germination and vigor of fava bean seeds. The Trichodel® isolate presented the highest normal seedling lengths. After inoculation, it was possible to observe symptoms of necrosis in the primary root and vascular dimming at 21 days. For the characterization, a total of 10 isolates were described morphologically in the BDA and SNA media, presenting a wide morphological variability.

Keywords: Antagonism, Morphological characterization, Physiology of seedlings, Promotion of growth.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Aspectos gerais da cultura do feijão fava (<i>Phaseolus lunatus</i>)	15
3.2 O gênero <i>Fusarium</i>	17
3.3 Controle Biológico de Patógenos	19
3.4 O gênero <i>Trichoderma</i>	20
4. METODOLOGIA	22
4.1 Isolamento e seleção de Isolados de <i>Fusarium</i>	22
4.2 Caracterização morfológica de <i>Fusarium</i>	22
4.3 Obtenção dos isolados de <i>Trichoderma</i>	23
4.4 Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i>	23
4.5 Controle <i>in vivo</i> de <i>Fusarium</i> sobre sementes de feijão fava	24
4.6 Controle <i>in vivo</i> de <i>Fusarium</i> sobre sementes de feijão fava	25
4.7 Qualidade fisiológica de sementes tratadas com <i>Trichoderma</i>	26
4.8 Análise dos resultados e delineamento estatístico	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Análise do antagonismo de <i>Trichoderma</i>	28
5.2 Transmissão de sementes <i>in vitro</i>	32
5.3 Controle <i>in vivo</i> de <i>Fusarium</i> sobre sementes de feijão fava	33
5.4 Avaliação fisiológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sobre o tratamento do <i>Trichoderma</i>	36
5.5 Análise sanitária das sementes de feijão fava	42
5.6 Caracterização dos isolados de <i>Fusarium</i>	45
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), é a segunda leguminosa de maior importância do gênero *Phaseolus*, ficando atrás somente do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (SANTOS, 2008). Devido ao conteúdo proteico e paladar característico, é mundialmente utilizado em pratos, nas mais diferentes culinárias e regiões, recebendo várias denominações, em função da região cultivada ou forma de utilização na alimentação (VAZ PATTO, 2015).

Esta espécie é amplamente distribuída em regiões climáticas e solos distintos, apresentando uma enorme capacidade de adaptação e constituindo benefícios para a agricultura. Apesar de destacar-se no Nordeste e do seu potencial de produção, apresenta baixa produtividade, pois pouca atenção por parte dos órgãos de pesquisa e extensão são dadas, resultando em um conhecimento limitado à respeito do seu manejo nos mais diferentes aspectos, como também a presença de consórcios impacta este índice, tornando a fava como cultura marginal (SANTOS, 2002; GOMES, 2015; VAZ PATTO, 2015).

O Estado da Paraíba tem essa cultura como de alta relevância, uma vez que a sua produtividade equivale a quase 50% em relação à região Nordeste, sendo uma espécie cultivada em quase todas as microrregiões do Estado, destacando-se os municípios de Queimadas, Aroeiras, Campina Grande, Alagoa Nova, Alagoa Grande e Natuba, obtendo uma produtividade de aproximadamente 3.637 t de grãos de fava, numa área plantada de 20.209 ha, na safra de 2016 (IBGE, 2016).

Entretanto, a produção do feijão fava sofre alguns entraves com a presença de patógenos, que danificam as sementes e podem diminuir os índices da produção. Um dos fatores que contribui para isto é, sem dúvida, a utilização de sementes com baixa qualidade sanitária pelos produtores. As sementes constituem, para a maioria dos fitopatógenos, um meio eficiente de sobrevivência e disseminação e, conseqüentemente, de introdução de doenças em novas áreas de cultivo (SILVA-FLÁVIO et al., 2014). Os principais danos que os microrganismos causam são a morte de plântulas pré e pós-emergência, podridões radiculares, infecção da parte aérea com reflexos sobre a qualidade de sementes, gerando perda de vigor, germinação e apodrecimento (NASCIMENTO; MEDEIROS, 2015).

O ascomiceto *Fusarium* é um gênero diverso e em muitos casos é responsável pela destruição de diversas culturas, entre elas, do feijão fava. É um fungo cosmopolita que causa escurecimento vascular de várias plantas. Seus principais sintomas incluem escurecimento do feixe vascular, tombamento, murcha, podridão de raiz, desfolhação e morte da planta (AGRIOS, 2005; DEAN et al., 2012)

A principal medida de controle é a utilização de cultivares resistentes, porém, a obtenção de cultivares resistentes é dificultada pela existência de raças patogênicas e sua distribuição geográfica ampla, como também a identificação de genes de resistência e habilidade de adaptação que eles possuem a novos genótipos de plantas podem tornar a resistência uma solução temporária (ALVES-SANTOS et al., 2002; COSTA et al., 2009). Entretanto, nem todos os microrganismos são maléficos às plantas. Podem desempenhar um importante papel na proteção de plantas aumentando a capacidade de resistência contra os patógenos, exibindo atividades antagonistas ou agindo como elicitores à partir de diferentes fatores ambientais (BHATTACHARYYA et al., 2016).

Diante disto, o controle biológico é uma alternativa que consiste no controle de um organismo vivo utilizando outro organismo, dito como antagonista. Além disso, não contamina o meio ambiente deixando resíduos e possui fácil aplicação (SOARES, 2006).

O gênero *Trichoderma*, é um dos mais estudados atualmente como alternativa de controle biológico de pragas. É um fungo de vida livre presente nos mais diversos ecossistemas do solo. É um organismo oportunista, avirulento às plantas, realizando uma relação de simbiose e parasita de outros fungos. Produz uma variedade de compostos que induzem respostas localizadas ou sistêmicas das plantas, causando mudanças substanciais no seu metabolismo (HARMAN et al., 2004). As espécies de *Trichoderma* são reconhecidas como agentes de controle de doenças e sua habilidade de promover o crescimento e desenvolvimento da planta. São amplamente utilizadas na horticultura, sendo capazes de colonizar e crescer em associação com raízes de plantas (HARMAN, 2000).

Portanto, a identificação correta do patógeno é essencial no manejo de doenças de plantas, possibilitando métodos de controle adequados e específicos para o problema. Além disso, o desenvolvimento de estratégias eficazes para controlar a podridão e murcha-de-fusarium em feijão fava, pode inserir o uso de antagonistas no controle de doenças do feijoeiro, constituindo de uma alternativa sustentável para um melhor investimento no cultivo desta cultura.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterização de *Fusarium* em sementes de feijão fava e a ação de *Trichoderma* no controle do patógeno *in vitro* e *in vivo*, bem como, definir a ação dos antagonistas sob a qualidade fisiológica das sementes e plântulas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar, *in vitro*, isolados de *Fusarium* a partir de sementes de feijão fava provenientes de diferentes regiões de cultivo no estado da Paraíba;
- Caracterizar morfológicamente os isolados de *Fusarium*;
- Determinar a ação de *Trichoderma* no controle de *Fusarium in vitro* e *in vivo*;
- Determinar a transmissão de *Fusarium* em plântulas de feijão fava a partir das sementes;
- Definir a influência de *Trichoderma* no vigor de sementes e no desenvolvimento fisiológico de plântulas de feijão fava;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Aspectos gerais da cultura do feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.)

O feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.) é originário da Guatemala e é a segunda leguminosa de maior importância do gênero *Phaseolus*, por apresentar alto valor nutritivo, contendo vitaminas, proteínas e sais minerais, que são elementos essenciais na nutrição humana e vem sendo uma das alternativas de renda e alimento para a população da região Nordeste (PENHA, 2014).

O gênero *Phaseolus* pertence ao filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae (CRONQUIST, 1988). O número de espécies ainda é desconhecido, mas estudos filogenéticos indicam que todas as espécies do gênero *Phaseolus* surgiram do continente americano. A ampla variedade de subespécies de feijão fava torna-o essencial em relação ao teor nutricional e bioquímico (DELGADO-SALINAS, 1999; LACERDA et al., 2016).

Debouck (2008), afirma que o provável ancestral do feijão fava é amplamente distribuído do México para Argentina, baseado em dados provenientes de herbários. Essa diversificação

de diferentes espécies pode ter acontecido por meio de eventos tectônicos advindos da região mexicana. Devido à tal diversificação, as espécies selvagens de *Phaseolus* desenvolvem-se em condições ambientais e climáticas distintas, e sua distribuição geográfica reflete seus padrões de adaptação (DELGADO-SALINAS, 2006; BITOCCHI, 2017).

O feijão fava desenvolveu-se em altitudes menores, em relação ao feijão comum. Fatores naturais aliados à seleção natural podem ter contribuído para esta divergência evolutiva, porém, as bases genéticas de tal evento ainda permanecem desconhecidas. Populações selvagens de *P. lunatus* foram encontradas crescendo simpatricamente com populações domesticadas. As sementes selvagens não são semeadas ou colhidas, pois não são comestíveis (MARTINEZ-CASTILLO et al., 2004; MARTINEZ-CASTILLO et al., 2007; LI et al., 2015).

As principais características que permitem a identificação do feijão fava, sendo a germinação epígea; as folhas geralmente apresentam coloração escura, mesmo depois do amadurecimento das vagens; as bractéolas pequenas e pontiagudas; vagens bastante compridas e de forma geralmente oblonga e recurvada, e o número de sementes variando de duas a quatro por vagem (ZIMMERMANN et al., 1996).

A qualidade sanitária das sementes é um dos mais importantes aspectos relacionados à produtividade, devido ao grande número de patógenos serem causadores de doenças. Microrganismos podem causar anormalidades e lesões nas plântulas, bem como deterioração do tecido embrionário, comprometendo a germinação e vigor das sementes e consequentemente perdas de produção (MOREAU, 2011).

Dentre prejuízos em sementes causados por patógenos, destacam-se uma considerável redução do peso, diminuição da qualidade nutricional, declínio do poder germinativo das sementes, depreciação comercial devido a presença de insetos adultos ou imaturos, fragmentos e excrementos (SARI, 2003).

A fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, destaca-se como causadora da podridão radicular e murcha vascular e ocasiona grandes perdas nos campos de produção mundialmente, sendo considerada uma das principais doenças do feijoeiro (BURUCHARA; CAMACHO, 2000).

3.2 O gênero *Fusarium*

Fusarium é um gênero diverso e cosmopolita de fungos filamentosos. Seus membros representam um dos mais importantes grupos de patógenos, nos quais afetam a agricultura e a horticultura mundial. Apresenta uma alta diversidade morfológica, fisiológica e ecológica, ocorrendo na maioria dos nichos ecossistêmicos. Sua abrangência inclui de saprofitismo, produção de micotoxinas, e patógenos de uma ampla gama de culturas, sendo relatados também aos humanos (BURGESS et al., 1997; O'DONNELL, 1997; SUMMERELL et al., 2010; KARLSSON et al., 2016).

A maioria das espécies de *Fusarium* possuem um estágio saprofítico e são habitantes comuns do solo, onde persistem na forma de micélio ou como clamidósporos (esporos dormentes). Essas espécies, geralmente formam complexos compostos por patótipos representados por várias *formae speciales* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Produzem uma ampla variedade de micotoxinas, incluindo os tricotecenos e fumosinas, que são prejudiciais à humanos e animais, além disso, é reconhecido pela produção de metabólitos secundários que influenciam na produção hormonal das plantas, como a giberelina, hormônio de crescimento (O'DONNELL, 1996; ALEXANDER et al., 2011). A importância do gênero foi retratada por Dean et al., (2012), onde *Fusarium graminearum* e *F. oxysporum* são associados entre os dez mais importantes patógenos, científica e economicamente.

Na literatura, é possível notar a predominância dos complexos *solani* e *oxysporum* como causadores de quase todas as enfermidades de plantas. Em relação ao feijoeiro-comum, é possível encontrar registros de duas *formae speciales* presentes nesta cultura; o *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (MIRANDA et al., 2007; EKE et al., 2016) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (MARINGONI, 1999; XUE et al., 2015; BORBA et al., 2017) e ainda o *Fusarium falciforme* descrito recentemente por Sousa (2016).

Por muito tempo, as classificações em nível específico de *Fusarium* eram baseadas exclusivamente em caracteres morfológicos, muitas vezes conflitantes. O principal problema dessa classificação em microfungos, é em relação ao número de caracteres morfológicos, que são poucos em relação ao número de espécies existentes. Por esta razão de divergência taxonômica, uma análise molecular filogenética permite uma classificação sistemática mais precisa do gênero (BRUNS et al., 1990; O'DONNELL, 1997; SUMMERELL et al., 2010).

Os membros do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) são cosmopolitas do solo e representam o mais comum e mais importante economicamente complexo de espécies de *Fusarium*. Apresentam uma ampla variedade de hospedeiros, com severas perdas em diversas culturas como tomate, algodão e banana. Uma das mais importantes doenças do feijoeiro comum é a podridão de raiz causada por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, presente em todos os campos de produção (O'DONNELL, 2009; DEAN et al., 2012; XUE et al., 2015).

A infecção por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ocorre pela penetração nos tecidos da raiz; sucede-se a colonização dos tecidos vasculares da raiz, caule ou a planta inteira, causando o bloqueio do floema, e descoloração interna do caule. Além disso, ocorrem alterações no desenvolvimento da planta, como atraso no crescimento e murcha, clorose e necrose das folhas e consequentemente a morte da planta (XUE et al., 2015).

Fusarium solani é um complexo de espécies que abriga diversas espécies filogenéticas distintas (O'DONNELL et al., 2000; O'DONNELL et al., 2008). Tais espécies são alocadas em três clados; o clado 1 apresenta apenas duas espécies, ambas da Nova Zelândia; o clado 2 (O'DONNELL et al., 2000) composto por oito espécies filogenéticas e pertencentes à América do Sul; e o clado 3 (MATUO; SNYDER, 1973) composto por dezoito espécies, sendo o clado mais comum e diverso.

Fusarium solani f. sp. *phaseoli* é um dos responsáveis da podridão de raiz do feijoeiro. É altamente patogênico e a infecção ocorre quando o sistema radicular está sob estresse, baixas temperaturas do solo, excesso de umidade e déficit de nutrientes. A característica da podridão de raiz é a descoloração avermelhada da raiz principal que se estende ao solo (MULLIGAN et al., 1990).

Fusarium falciforme é uma espécie distribuída em solos de diversos países e pertence ao clado 3, grupo mais comum do gênero associado à diversas doenças de plantas e humanos (CHEHRI et al., 2015). Os sintomas descritos por Sousa (2016) incluem a coloração negra e diminuição do desenvolvimento das raízes principais e secundárias, onde apresentaram necrose, com desenvolvimento comprometido, como também o desenvolvimento de estrias longitudinais amarronzadas na região do colo.

Essa distribuição é preocupante, principalmente no que se refere ao feijão fava, onde informações escassas são encontradas na literatura sobre seus agentes etiológicos. Os casos citados de podridão são alarmantes, pois ocasionam perdas para as lavouras, e devido ao baixo índice tecnológico da produção, estratégias de manejo integrado de doenças se tornam

uma exigência nos campos de produção. Portanto, a descrição dos patógenos e métodos de controle são fatores essenciais para mitigar esse índice.

3.3 Controle Biológico de Patógenos

O uso de compostos químicos no controle de doenças de plantas, pragas e plantas invasoras, além de causarem sérios problemas ambientais, como contaminação de alimentos, do solo, água, e redução da biodiversidade, podem colaborar com o aumento da resistência de patógenos. Quanto mais específico é o efeito do químico no organismo, maior é a probabilidade da diminuição do efeito através das mudanças genéticas populacionais (TJAMOS et al., 1992; BENÍTEZ et al., 2004; BETTIOL; MORANDI, 2009).

Perante a perspectiva agroecológica, a diminuição do uso de substâncias químicas vem tornando-se um requisito para as grandes empresas. Portanto, o aumento da preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente tem aumentado pesquisas para a redução do uso de agrotóxicos, como também tem motivado o uso de métodos alternativos. A perspectiva do controle biológico tem crescido nas discussões, tanto com o controle biológico natural, quanto na introdução de um agente de controle biológico (BETTIOL; MORANDI, 2009; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Uma promissora alternativa biológica, é o uso de microrganismos que produzem metabólitos voláteis com ação antagonica à pragas e patógenos de plantas. Portanto, as pesquisas por novas ferramentas biotecnológicas tornam-se importantíssimas, de modo que sejam amigáveis ao meio ambiente e possam ser utilizadas no controle de patógenos (GLARE et al., 2012; SCHALCHLI et al., 2016).

Organismos potencialmente benéficos e antagonicos, podem suprimir o crescimento de fitopatógenos de inúmeras formas, como: competindo por nutrientes, espaço, e limitando a disponibilidade de nutrientes para o patógeno. Alguns gêneros de fungos já foram descritos como antagonicos e com a capacidade de produzir antibióticos, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*. (ZIVKOVIC et al., 2010; MARASCO et al., 2012).

Atualmente, existem diversas pesquisas que comprovam a ação benéfica de alguns microrganismos na proteção de plantas e controle de patógenos. Zhai et al. (2016) demonstraram um alto índice de inibição por *Clonostachys rosea* contra várias cepas de bactérias, demonstrando seu potencial de agente de controle biológico; Braga-Junior (2017) avaliou o efeito antagonista de *Bacillus subtilis* sobre *Fusarium subglutinans* e comprovou-se o controle, chegando à total inibição. Sreevidya et al, (2015) analisando cepas de *Penicillium*

citrinum tanto em condições de ambiente protegido e campo, inibiram *Botrytis cinerea* e ainda promoveram o crescimento de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

3.4 O gênero *Trichoderma*

Trichoderma, é um gênero de fungos que reproduzem-se assexuadamente, e são frequentemente isolados do solo, e em solos tropicais são encontrados em quase todas as temperaturas. Este gênero, apresenta organismos de vida livre que inter-relacionam-se com raízes, solo e folhas. As espécies de *Trichoderma*, vem sendo amplamente estudado para fins de manejo de doenças em plantas e pela capacidade de promover crescimento e desenvolvimento de plantas (HARMAN, 2004; SABA et al., 2012).

Morfológicamente, *Trichoderma* apresenta características facilmente identificáveis, como: rápido crescimento, colônia pulverulenta, conídios de coloração esverdeada ou amarelo esverdeado, e conidióforos bem definidos com aspecto piramidal. Os conídios da maioria das espécies são menores do que 5 µm, e podem ser globosos, subglobosos, elipsoidais ou oblongos. A maioria das espécies crescem em ágar rapidamente juntamente com o amadurecimento dos conídios. É facilmente diagnosticada visualmente, por meio do micélio aéreo e sua pigmentação difusa, com tons de verde à amarelo (SAMUELS, 1996).

O sucesso deste gênero na rizosfera deve-se a sua alta capacidade reprodutiva, por meio da produção e dispersão de conídios, habilidade de desenvolver-se em condições ambientais desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera e a alta agressividade contra fungos fitopatogênicos (BENÍTEZ et al., 2004; CARRERAS-VILLASEÑOR et al., 2012).

Os agentes de controle biológico são organismos que dependem principalmente de diferentes condições ambientais, por essa razão, o controle biológico por isolados de *Trichoderma* pode ser imprevisível. O mico-parasitismo apresenta uma ordem de eventos: primeiramente, as cepas de *Trichoderma* detectam outros fungos e crescem em direção à eles; e quando em contato, ataca o hospedeiro e pode enrolar-se e produzir apressórios na superfície hospedeira. Além disso, produz inúmeras enzimas fungitóxicas que degradam a parede celular do fungo hospedeiro (CHET et al., 1981; CHET et al., 1998; BENÍTEZ et al., 2004; HARMAN, 2004).

As estruturas químicas e antibióticas de *Trichoderma* apresentam baixo peso molecular, são apolares e voláteis, resultando em uma alta concentração de antibióticos na camada do solo, possuindo uma longa distância de influência na comunidade microbiológica. A interação

física entre *Trichoderma* e as plantas envolve mais uma relação de simbiose que uma relação de parasitismo, pois o fungo ocupa o nicho nutricional e a planta torna-se protegida de doenças (VINALE et al., 2008). Além de proteção, *Trichoderma* possui a capacidade de promover o crescimento e desenvolvimento da planta. Também é capaz de aumentar a absorção e concentração de uma variedade de nutrientes (cobre, fósforo, ferro, manganês e sódio) em culturas hidropônicas, mesmo sob condições axênicas (YEDIDIA et al., 2001; HARMAN et al., 2004).

Portanto, as consequentes interações entre planta e *Trichoderma*, inúmeros patógenos radiculares ou de outros órgão vegetais causam menos doenças em plantas colonizadas por *Trichoderma*. Sendo assim, um melhor entendimento dos mecanismos que operam a interação entre planta e microrganismos, como também nas comunidades presentes no solo, podem incitar o desenvolvimento de novos estudos biotecnológicos essenciais no controle de fitopatógenos e no aumento da produção (HARMAN et al., 2004; VINALE et al., 2008).

4. METODOLOGIA

Os lotes de sementes de feijão fava, variedade “Orelha de vó”, foram advindas de três municípios: Alagoa Grande, Remígio e Campina Grande, nos quais destacam-se pela produção de fava do estado da Paraíba. As sementes foram adquiridas de produtores da região e comerciantes em feira livre.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia-PB.

4.1 Isolamento e seleção de Isolados de *Fusarium*

Os lotes de sementes de feijão fava, de Remígio, Alagoa grande e Campina Grande, foram analisados em “blotter-test”, e após 7 dias de incubação, foram identificadas as estruturas reprodutivas de *Fusarium* spp. com auxílio do microscópio óptico. O isolamento foi feito utilizando-se de sementes de feijão fava contendo inóculo de *Fusarium* spp. e meio BDA (Batata, dextrose e ágar). Detectada a presença do patógeno, transferiu-se para o meio, fragmentos do patógeno.

Foram obtidos 10 isolados em cultura pura de *Fusarium* spp., e logo após foram preservados pelo método Castellani (1939).

4.2 Caracterização Morfológica de *Fusarium*

Após o isolamento e purificação das culturas, foi realizada a caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp. sendo utilizados os meios BDA e SNA (synthetic nutrient-poor ágar).

A coloração do verso e reverso das colônias, foram comparadas com (SUMMERELL et al, 2003; QUERALES, 2010). Os isolados cultivados em BDA a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ acondicionados em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand), foram analisados após o décimo segundo dia de cultivo.

O índice de velocidade de crescimento das colônias fúngicas foi mensurado em meio BDA, sob a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ acondicionados em estufa BOD, foi medido diariamente até o sétimo dia com o auxílio de régua graduada. Foram avaliadas para cada isolado, cinco placas com as colônias fúngicas. Uma placa de Petri foi considerada uma repetição. O IVCm foi estimado segundo a fórmula de Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = (D - D_a) / N$$

Sendo: IVC_M=índice de velocidade de crescimento micelial; D=diâmetro médio atual da colônia; D_a=diâmetro médio da colônia do dia anterior; N=número de dias após a inoculação na placa de Petri.

A mensuração de esporulação foi realizada à partir dos isolados crescendo em BDA, sob a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ acondicionados em estufa BOD, ao décimo terceiro dia de cultivo. A contagem de esporos foi realizada em suspensão aquosa com o acréscimo de 10 mL de ADE por repetição. A solução foi visualizada em câmera de Neubauer.

Para observação micromorfológica de *Fusarium* spp., foi utilizada a técnica de microcultivo em lâmina, onde um fragmento de meio de cultura e do patógeno foram cultivados sobre a lâmina histológica; e a observação direta das estruturas reprodutivas crescidas em meio SNA, foi realizada a partir da visualização de um pequeno fragmento do meio de cultura contendo o fungo, em lâmina, sob microscopia óptica.

A captura das estruturas do patógeno foi realizada no Laboratório de Histologia Veterinária, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, com o microscópio Olympus BX53, acoplado com a câmera Olympus DP73 e auxílio do programa cellSens Dimension.

Foram mensurados o comprimento e a largura de 10 conídios e 10 fiálides para cada isolado de *Fusarium*. As medidas dos conídios (macro e micronídios) e das fiálides, foram realizadas com o auxílio do software Motic Image Plus 2.0.

A morfologia das estruturas micromorfológicas de *Fusarium* spp. foram descritas com base na literatura disponível (SUMMERELL et al., 2003; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

4.3 Obtenção dos isolados de *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste trabalho foram obtidos do acervo da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba sendo escolhidos dois espécimes: *Trichoderma* sp.1 isolado à partir de sementes de algodoeiro (*Gossypium* sp.) e *Trichoderma* sp.2 derivado do produto comercial Trichodel® a base de *Trichoderma asperellum*. Ambos os isolados de *Trichoderma* foram para os testes de controle do *Fusarium* inoculados em sementes de feijão fava *in vitro* e em *in vivo*.

4.4 Avaliação do antagonismo *in vitro* de *Trichoderma*

O potencial de ação antagônica *in vitro* contra os isolados de *Fusarium* spp. e compostos voláteis foi avaliado por meio do teste de pareamento direto em placa de Petri e por meio da produção de compostos voláteis em placa sobreposta, conforme metodologia descrita por Carvalho et al., (2011), com modificações.

Utilizaram-se para este teste, 10 isolados de *Fusarium* spp., sendo inoculados em meio BDA três dias antes do antagonista, opostamente em cada placa. As placas foram submetidas na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa BOD, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações consistiram na medição diária do diâmetro das colônias diariamente do patógeno com régua milimétrica e utilizando-se da escala proposta por Bell et al. (1982), atribuindo notas que variam de 1 a 5, conforme segue: 1. Antagonista cresce e ocupa toda a placa; 2. Antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno, em torno de 2/3 da placa de Petri; 3. Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa onde nenhum domina o outro; 4. Patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista, em torno de 2/3 da placa de Petri; 5. Patógeno cresce e ocupa toda a placa.

Avaliou-se ainda, os índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação dos isolados de *Fusarium* spp. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições de *Fusarium* para cada isolado de *Trichoderma*, adicionalmente 4 placas para cada isolado de *Fusarium* foram utilizadas como testemunha, totalizando 120 placas.

Para análise do teste de metabólitos voláteis, após três dias de crescimento de *Fusarium* spp. em BDA a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, bases de outras placas de Petri de tamanho correspondente (9 cm), contendo meio BDA solidificado, receberam no seu centro um disco de ágar contendo crescimento dos antagonistas. As bases das placas contendo o antagonista recém colocado e o patógeno (com três dias de crescimento) foram sobrepostas e unidas com filme plástico transparente. As placas foram incubadas de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno.

Após a testemunha ocupar a placa, a medição realizada evidenciou o diâmetro das colônias de *Fusarium* spp. Considerou-se 100% de crescimento a área final ocupada pela testemunha menos a área inicial (patógeno com três dias de crescimento).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada isolado de *Trichoderma*, e com placas de *Fusarium* crescendo em BDA como testemunha, totalizando 120 placas.

4.5 Controle *in vitro* de *Fusarium* sobre sementes de feijão fava

As sementes foram desinfestadas em condições assépticas por meio de hipoclorito de sódio à 1%, seguido por álcool 70 % e ADE por três minutos e após a secagem adicionadas em meio BDA com o acréscimo de seis discos de colônia de *Fusarium* spp. por placa.

Para a obtenção de sementes infectadas e infestadas por *Fusarium*, utilizou-se a técnica de restrição hídrica utilizando BDA+ Manitol à aproximadamente -0,64 Mpa, de onde o cálculo da quantidade de Manitol a ser adicionada para a obtenção da tensão, utilizou-se a fórmula de Van't Hoff, citado por Salisbury; Ross (1992), onde: $\pi = -RTC$, em que: π = potencial osmótico (atm); R = constante geral dos gases perfeitos (0,082 atm.mol. L⁻¹.K⁻¹); T = temperatura (K); C = concentração (mol.L⁻¹); mol.L⁻¹ x massa molar do KCl = g.L⁻¹ e T (K) = 273+T (°C).

O isolado CMLF 06 que obteve melhor resultado nos testes de pareamento, foi cultivado em placas de Petri contendo BDA e incubado em condições controladas (25± 2 °C) durante 10 dias. A preparação do inóculo foi realizada pela adição de 10 mL de água destilada e esterilizada (ADE) em cada placa de Petri. Os conídios foram liberados com auxílio de um pincel com cerdas macias e a suspensão filtrada em gaze esterilizada. Os esporos foram mensurados em câmara de Neubauer, com a concentração ajustada para 1,0 x 10⁴ conídios/mL⁻¹.

As sementes de feijão fava variedade “Orelha-de-vó” foram imersas em suspensões dos dois isolados de *Trichoderma* spp., por um período de 5 minutos. Obtendo-se a suspensão dos antagonistas de 3,0 x 10⁸ conídios/mL⁻¹. Após 24 horas da microbiolização, as sementes mantidas em câmara úmida, compostas por bandejas com papel filtro esterilizado, umedecido e cobertas por sacos de polietileno umedecidos com ADE, foram inoculadas com *Fusarium* spp. através da imersão nas suspensão de esporos a concentração de 1,0 x 10⁴ conídios/mL⁻¹ por 5 min.

O experimento foi conduzido em DIC e foram utilizadas 100 sementes por tratamento, distribuídas em 5 placas de Petri (15 cm) contendo BDA, 20 sementes por placa, totalizando 400 sementes; acondicionadas sob fotoperíodo de 12 horas a 25 ± 2°C por 10 dias. Um tratamento adicional apenas com *Fusarium* spp. como testemunha e outro com o fungicida Captana, na dosagem de 240 g do produto para 100 kg de sementes.

As sementes foram avaliadas quanto a porcentagem de ocorrência do patógeno após 10 dias de incubação.

4.6 Controle *in vivo* de *Fusarium* sobre sementes de feijão fava

As sementes de feijão fava ‘Orelha-de-vó’ foram previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, álcool 70% e lavadas em ADE, por 3 minutos e imersas na suspensão dos dois isolados de *Trichoderma* (3,0 x 10⁸ conídios/mL⁻¹) por 5 minutos em Becker, agitando-se manualmente, sendo acondicionadas em câmara úmida, compostas por

bandejas com papel filtro esterilizado e umedecido e cobertas por sacos de polietileno umedecidos com ADE, em um período de 24 hrs.

Após esse período, foi realizada a inoculação de *Fusarium* spp. nas sementes, com o isolado CMLF 06. As sementes foram secas em condições ambiente, sobre papel *Germitest* esterilizado e semeadas em vasos com capacidade de 1,5 L. Contendo substrato comercial (turfa, palha de arroz) e vermiculita, esterilizados na proporção de 2:1 (substrato/vermiculita - v/v).

Foram realizados três métodos de inoculação: (1) por suspensão do inóculo do patógeno à $1,0 \times 10^4$ conídios/ml⁻¹, (2) por meio do contato direto com o patógeno em meio BDA, e (3) por contato direto com o patógeno em meio BDA+ Manitol. Adicionalmente, uma testemunha contendo inóculo do patógeno foi utilizada para fins de comprovação (4).

As variáveis analisadas foram: primeira contagem de emergência (PCE), índice de velocidade de emergência (IVE), o comprimento de parte aérea (CPA) e raiz das plântulas (CPR) normais e infectadas, além do corte de feixe vascular. Posteriormente, a parte aérea e o sistema radicular das plântulas, separadamente foram colocados em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65 °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula⁻¹.

4.7 Qualidade fisiológica de sementes tratadas com *Trichoderma*

Para avaliar a influência dos agentes biocontroladores sobre a qualidade fisiológica das sementes de feijão-fava 'Orelha-de-vó' foram realizados os testes de germinação conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

O experimento foi conduzido em DIC, com oito repetições de 50 sementes para cada tratamento. Utilizando-se 200 sementes, distribuídas em oito repetições de 25 sementes, tratadas nas suspensões de 1,5; 2,0; 2,5 e $3,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ de *Trichoderma* e colocadas em substrato de papel *Germitest*, umedecido com 2,5 vezes o peso do papel seco e distribuídos em câmara de germinação do tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.), regulada a 30°C sob fotoperíodo de oito horas. Após o semeio, os substratos contendo as sementes foram acondicionados em sacos plásticos transparentes, com a finalidade de evitar a perda de água por evaporação. As contagens de sementes germinadas foram realizadas diariamente do 3º ao 14º dia, contabilizando-se o percentual de sementes normais germinadas. A primeira contagem de germinação foi conduzida conjuntamente com o teste de

germinação, onde se contabilizou-se as sementes germinadas no terceiro dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi conduzido em conjunto com o teste de germinação, onde foi anotado diariamente o número de sementes germinadas. O índice foi determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1 + G_2 + \dots + G_3 + G_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Onde: IVG = índice de velocidade de germinação; G1, G2 e Gn = número de sementes germinadas no primeiro, segundo e último dia; N1, N2 e Nn = número de dias decorridos da semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O Teste de Emergência foi realizado em casa de vegetação, dispostos em DIC com quatro repetições de 25 sementes, tratadas nas suspensões de 1,5; 2,0; 2,5 e $3,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ de *Trichoderma* semeadas em bandejas plásticas com dimensões de 49 x 33 x 7,0 cm de comprimento, largura e profundidade, respectivamente, contendo substrato comercial (turfa, palha de arroz) e vermiculita, esterilizados na proporção de 2:1 (substrato/vermiculita - v/v), cuja manutenção da umidade foi por meio de regas diárias. Para a contagem de plântulas normais emergidas, foi utilizado o critério de emissão dos cotilédones acima do substrato, sendo analisado a primeira contagem (PCE), emergência (EM), índice de velocidade de emergência (IVE) utilizando a mesma fórmula de Maguire (1962), além de sementes mortas e duras.

O comprimento de plântulas da parte aérea (CPA), raiz (CPR) e plântula (CPL) foram realizados após o teste de emergência, com o auxílio de uma régua graduada em milímetros. Posteriormente, foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSPR) e total (MSTO) em que foram colocadas separadamente em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65 °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula⁻¹.

4.8 Análise dos resultados e delineamento estatístico

O IVC, esporulação e tamanho dos conídios do tópico 4.2, foram analisados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). As análises estatísticas foram realizadas no

programa SAS ®. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 1% de probabilidade pelo SAS ®.

Os resultados obtidos dos tópicos de 4.4 à 4.7 foram expressos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) pelo esquema fatorial, tendo o modelo de regressão ajustado de acordo com as concentrações. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS ®. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 1% de probabilidade pelo SAS®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do antagonismo de *Trichoderma*

O teste de confronto direto (Figura 1) mostrou que todos os isolados de *Trichoderma* spp. cresceram rapidamente, chegando a inibir o crescimento total do patógeno do quinto ao sexto dia de cultivo. A maioria dos isolados, mesmo com três dias de cultivo anterior em relação ao antagonista não obtiveram crescimento significativo frente aos tratamentos. Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues et al., (2018), onde os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram crescimento superior ao patógeno, estabilizando seu crescimento rapidamente.

O isolado CMLF 01 apresentou os maiores índices de crescimento no tratamento com *Trichoderma* spp., até o sétimo dia de cultivo, porém, no décimo terceiro dia, sofreu colonização total por parte do antagonista. O mesmo isolado obteve índices reduzidos quando tratado com o Trichodel®. Os dados demonstraram que ocorreu interação significativa entre antagonista *versus* período, pois o tratamento com o Trichodel® quando comparado ao *Trichoderma* spp. aos sete dias de cultivo, não apresentou diferença significativa, porém, o tratamento com *Trichoderma* spp. ao décimo terceiro dia de cultivo foi superior ao Trichodel® para todos os isolados, obtendo a nota 1 (Tabela 2).

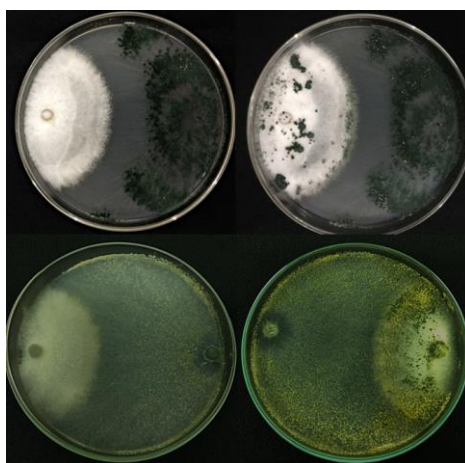


Figura 1. Cultura pareada *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. aos sete e treze dias de cultivo (AREIA-PB, 2018).

O índice de velocidade de crescimento micelial da cultura pareada (Tabela 2), avaliado até o décimo terceiro dia, permitiu a escolha do isolado proeminente de *Fusarium* (CMLF 06), pois apresentou índices de crescimento elevado na testemunha e se mostrou agressivo perante os demais tratamentos.

Tabela 1. Escala de notas aplicada ao crescimento do antagonista e patógeno perante ao teste de cultura pareada

7 DIAS				13 DIAS		
<i>Fusarium</i> spp.	TEST	<i>Trichoderma</i> spp.	TRICHODEL®	TEST	<i>Trichoderma</i> spp.	TRICHODEL®
CMLF 01	5 aAA	4,5 aAA	2,2 bcBCA	5 aAA	1,0 aAB	1,5 cbCBB
CMLF 02	5 aAA	2,2 cCA	2 cCA	5 aAA	1,0 aAB	1,0 cCB
CMLF 03	5 aAA	2 cCA	2 cCA	5 aAA	1,0 aAB	2 bBA
CMLF 04	5 aAA	2 cCA	2,7 baBAA	5 aAA	1,0 aAB	1,0 cCB
CMLF 05	5 aAA	3 cBA	3,0 aAA	5 aAA	1,0 aAB	1,0 cCB
CMLF 06	5 aAA	2 cCA	3,0 aAA	5 aAA	1,0 aAB	3,0 aAA
CMLF 07	5 aAA	2,5 cbCBA	2 cCA	5 aAA	1,0 aAB	1,0 cCB
CMLF 08	5 aAA	1 dDA	1 dDA	5 aAA	1,0 aAA	1,0 cCA
CMLF 09	5 aAA	2 cCA	2 cCA	5 aAA	1,0 aAB	1,0 cCB
CMLF 10	5 aAA	1 dDA	2cCA	5 aAA	1,0 aAA	1,0 cCB
CV. %			8,94			

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

O isolado CMLF 02, apresentou o maior crescimento micelial na testemunha, entretanto, reduziu significativamente o crescimento perante os demais tratamentos. O menor índice de

controle foi proporcionado pelo tratamento Trichodel[®], para o isolado CMLF 09, reduzindo significativamente seu crescimento.

Carvalho et al. (2011), confrontando *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* pelo mesmo método observaram resultados semelhantes, onde os valores médios observados nas culturas durante ao sétimo dia de cultivo foram menores que a testemunha; já ao décimo terceiro dia de cultivo observou a colonização total de *Trichoderma* sobre o patógeno. A competição por carbono, nitrogênio e outros fatores, juntos com a competição por espaço no substrato utilizado, podem ser atribuídas à redução do crescimento de *Fusarium* spp. (VINALE et al., 2008).

Tabela 2. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de *Fusarium* spp. submetido ao controle biológico com *Trichoderma in vitro*. UFPB, Areia, PB, 2018.

<i>Fusarium</i> spp.	TEST	<i>Trichoderma</i> spp.	TRICHODEL [®]
CMLF 01	17,46 aA	13,8175 bA	11,67 bB
CMLF 02	20,17 aA	4,9925 cD	10,1075 bC
CMLF 03	15,26 aB	9,7825 bC	9,085 bC
CMLF 04	17,135 aA	8,805 bC	15,0625 bC
CMLF 05	16,02 aB	9,285 bC	9,46 bC
CMLF 06	18,36 aA	14,35 bA	15,125 bA
CMLF 07	10,175 aC	8,8725 aC	9,95 aC
CMLF 08	17,98 aA	12,6 bB	12,5575 bB
CMLF 09	17,78 aA	11,67 bB	7,0975 cD
CMLF 10	17,54 aA	14,555 bA	9,7425 cC
CV %		11,9	

*Letras minúsculas diferentes indicam diferenças dentro de cada isolado e maiúsculas, diferenças entre cada isolado e tratamento pelo teste de Tukey (p<0,05).

Jana; Mandal (2017), analisando o pareamento de *Trichoderma harzianum* obtiveram até 71% de inibição do crescimento de *Sclerotium rolfsi*. Lima et al. (2016) observaram que os isolados confrontados de *Fusarium* sp. e *Bipolaris* sp. tiveram seu crescimento fortemente inibidos pelos tratamentos, considerando uma área de equivalente de 66 % no crescimento do antagonista na cultura. Outros isolados de *Trichoderma* spp., obtiveram o crescimento de 100% da área da cultura, inibindo completamente o crescimento do patógeno.

Os valores médios de esporulação (Tabela 3) do patógeno foram mensurados a partir do teste de cultura pareada após o décimo terceiro dia de cultivo.

Tabela 3. Níveis de esporulação dos isolados de *Fusarium* spp., frente ao método de pareamento de culturas com *Trichoderma*.

NÚMERO DE ESPOROS (1,0x10 ⁴)			
<i>Fusarium</i> spp.	TEST	<i>Trichoderma</i> spp.	TRICHODEL [®]
CMLF 01	4,06 edA	0,5cA	2,56 aA
CMLF 02	17,68 cebdBA	31,5 bB	13,12 aB
CMLF 03	129,56 aA	15,93 cbBA	12,31 aB
CMLF 04	27 cbdA	11,43 cbBA	1,37 aB
CMLF 05	38 cbB	59,93 aA	4,37 aC
CMLF 06	2,75 eA	0,56 cA	0 aA
CMLF 07	39,93 bA	1,87 cB	9,93 aB
CMLF 08	16,06 cedA	0,56 cA	0,12 aA
CMLF 09	5 edA	0,75 cA	2,75 aA
CMLF 10	1,31 eA	0,06 cA	0,12 aA
CV. %	68,2		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01).

Foi verificado ao décimo terceiro dia de cultivo, que os isolados CMLF 03, CMLF 04, CMLF 07 apresentaram uma redução significativa (p< 0,01) na esporulação em comparação com a testemunha quando pareados com o *Trichoderma* spp. O isolado CMLF 03 reduziu significativamente a esporulação nos dois tratamentos, chegando a 91% de inibição de esporulação no tratamento com o Trichodel[®]; o isolado CMLF 04 também apresentou uma diferença significativa para o Trichodel[®], porém o tratamento com *Trichoderma* spp. não diferiu estatisticamente da testemunha. O isolado CMLF 07 apresentou redução significativa em relação aos dois tratamentos. O isolado CMLF 06 em relação ao Trichodel[®], reduziu à 100% o nível de esporulação, porém, não diferiu estatisticamente do *Trichoderma* spp. e da testemunha. O isolado CMLF 05, apresentou níveis de esporulação superiores à testemunha no tratamento com o *Trichoderma* spp., porém, o Trichodel[®] reduziu a esporulação do patógeno significativamente.

Rodrigues et al., (2018), demonstraram que os tratamentos com *Trichoderma* spp. foram capazes de reduzir a esporulação significativamente em oito isolados de doze testados, porém, nenhum dos isolados testados foi capaz de inibir totalmente a esporulação. Zivkovic et al., (2010), verificou que suspensões de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium roseum* reduziram significativamente a esporulação de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloesporioides* em 86% e 89% respectivamente.

Para o teste de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp., não foi observado significância nos dados analisados.

5.2 Transmissão de sementes *in vitro*

O tratamento com *Trichoderma* spp. na concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} foi o mais significativo no controle de *Fusarium* spp. (Figura 2).

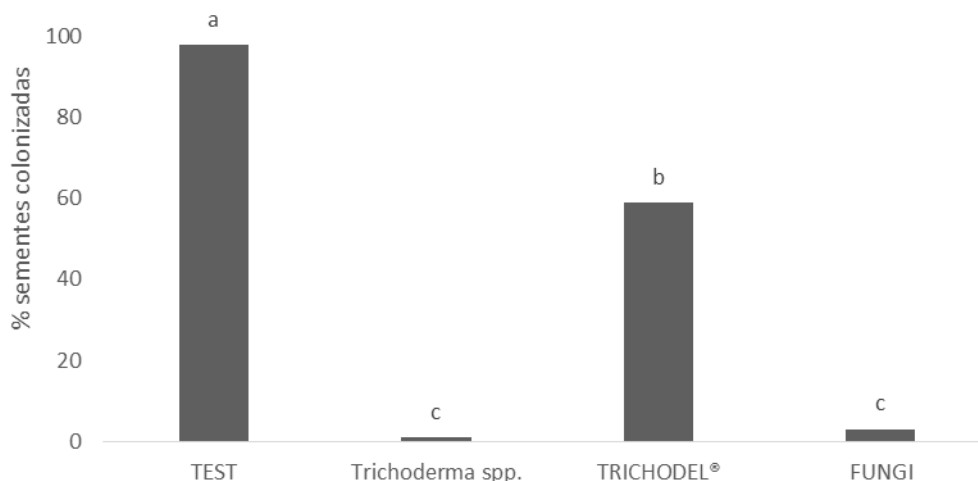


Figura 2. Controle Biológico de sementes colonizadas por *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp.

Foi observada uma diminuição de 99% no índice de sementes de feijão fava infectadas pelo patógeno aos dez dias de crescimento, sendo superior ao tratamento com o fungicida, porém, não houve diferença estatística entre estes tratamentos. O Trichodel® na concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} apresentou 59% das sementes infectadas com o patógeno, não sendo tão eficiente quando comparado ao *Trichoderma* spp. e ao fungicida Captana®. Todos os tratamentos apresentaram-se significativos em relação a testemunha, ao nível de significância à 1%.

Carvalho et al., (2011), analisando o controle de *T. harzianum* sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, demonstraram que embora nenhum dos tratamentos tenha sido similar ao tratamento químico, os tratamentos foram superiores à testemunha, reduzindo a incidência do patógeno em até 51%.

Apesar da presença do patógeno na semente não significar que sua fisiologia esteja comprometida, o controle de doenças pré-plantio, aliado ao tratamento alternativo de sementes, faz com que seja considerado na agricultura moderna uma das medidas de controle mais recomendadas, possibilitando um menor uso de defensivos agrícolas (NASCIMENTO; MEDEIROS, 2015).

5.3 Controle *in vivo* de *Fusarium* em sementes de feijão fava

O isolado CMLF 06, mais agressivo nos testes *in vitro*, foi utilizado para o teste de patogenicidade em casa de vegetação. Durante 21 dias após inoculação (DAI), foram realizadas as avaliações da qualidade fisiológica (Tabela 4).

Para os índices de comprimento de parte aérea (CPA) houve significância ($p < 0,01$). O tratamento 7, com suspensão de *Fusarium* spp $1,0 \times 10^4$, apresentou os menores índices dentre os tratamentos, com médias de 16 cm e inferiores à testemunha. O maior índice de comprimento de parte aérea refere-se ao tratamento 6, com contato direto BDA+Manitol *Fusarium* spp. + Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$, apresentando médias de 25,2 cm e as plantas mais vigorosas dentre os tratamentos.

Carvalho (2016) utilizando um potencial osmótico de $-0,70 \text{ MPa}^{-1}$ em soja (*Glycine max*), relataram efeito negativo na cultivar analisada, apresentando redução no vigor em resposta ao estresse hídrico. Machado Neto et al., (2004) relataram que os potenciais osmóticos de $-0,30 \text{ MPa}^{-1}$ a $-0,90 \text{ MPa}^{-1}$ ocasionaram decréscimos gradativos ao comprimento de parte aérea e radícula, em plântulas de soja. Neste trabalho, utilizou-se um potencial osmótico de $-0,64 \text{ MPa}^{-1}$ relativamente próximo ao potencial citado anteriormente, não apresentando redução no vigor das plantas analisadas no tratamento.

Para a variável de comprimento de raiz (CPR) não houve significância ao nível de probabilidade à 1%. O maior índice foi no tratamento 6, de 25,2 cm, porém os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. O maior índice de raízes ter ocorrido no tratamento 6 (contato direto BDA+ Manitol *Fusarium* spp. + Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$) deve-se, provavelmente ao estresse hídrico submetido pelo manitol, que proporcionou um maior desenvolvimento das raízes das plantas de feijão fava, enquanto que as plantas submetidas à disponibilidade hídrica adequada apresentaram menores índices (ÁVILA, 2007).

Tabela 4. Variáveis de comprimento de parte aérea, raiz, comprimento total de plântula, velocidade de emergência (IVE), porcentagem de emergência (PCE) e emergência (EM), expressas em porcentagem (%) de plantas de feijão fava submetidas ao Controle Biológico com *Trichoderma* (AREIA-PB, 2018).

		Comprimento (cm)			Emergência %		
	Tratamentos	CPA	CPR	CPL	IVE	PCE	EM
	TEST	18,2 ba	16,3a	34,5 b	0,9 b	20 b	32,5a
	T 1	19,24 ba	17,8a	37 ba	1,2 ba	35 ba	42,5a
	T 2	21,04 ba	19,8a	40,8 ba	1,9 ba	52,5 ba	52,5a
	T 3	22,3 ba	19,6a	41,9 ba	2,4 a	65 a	67,5a
	T 4	22,9 b	19,4a	42,3 ba	0,8 b	20 b	32,5a
	T 5	15,88 b	14,3a	30,2 b	1,4 ba	42,5 ba	45a
	T 6	25,2 a	25,4a	50,6 a	2,4 a	70 a	77,5a
	T 7	16 b	18,7a	34,7 b	1,7 ba	42,5 ba	60a
CV%	-	19,7	31,4	18,1	62,6	73,8	63

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). (TEST) Testemunha absoluta; (T1) Suspensão Trichodel® $3,0 \times 10^8$ + Suspensão de *Fusarium* spp $1,0 \times 10^4$; (T2) Contato direto BDA *Fusarium* spp. + Suspensão Trichodel® $3,0 \times 10^8$; (T3) Contato direto BDA+Manitol *Fusarium* spp. + Suspensão Trichodel® $3,0 \times 10^8$; (T4) Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$ + Suspensão de *Fusarium* spp $1,0 \times 10^4$; (T5) Contato direto BDA *Fusarium* spp. + Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$; (T6) Contato direto BDA+Manitol *Fusarium* spp. + Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$; (T7) Suspensão *Fusarium* spp $1,0 \times 10^4$.

Carvalho (2016) observou uma redução significativa proporcional do comprimento de raiz para as cultivares de soja analisadas, à medida que o potencial osmótico aumentou e consequentemente o estresse hídrico, fato não observado nas plantas de feijão fava avaliadas.

O comprimento total de plântulas (CPL) apresentou os maiores índices no tratamento 6 (contato direto BDA+ Manitol *Fusarium* spp. + Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$), com médias de 50,6 cm, e os menores índices para o tratamento 5 (Contato direto BDA *Fusarium* spp. + Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$) e tratamento 7 inoculado com *Fusarium* spp. com médias de 30,2 cm e 34,7 cm, não diferindo da testemunha que apresentou médias de 34,5 cm. Resultados semelhantes foram descritos por Sousa (2016), onde as plantas inoculadas com *Fusarium falciforme* apresentaram uma forte redução de crescimento.

O índice de velocidade de emergência (IVE) apresentou significância ($p < 0,01$). Com os maiores índices para os tratamentos 3 (Contato direto BDA+ Manitol *Fusarium* spp. + Suspensão Trichodel® $3,0 \times 10^8$) e 6, com médias de 2,4%. Os menores índices foram observados nos tratamentos 4 (Suspensão *Trichoderma* spp. $3,0 \times 10^8$ + Suspensão de

Fusarium spp. $1,0 \times 10^4$) e testemunha, com 0,8 e 0,9%. A primeira contagem de emergência (PCE) ($p < 0,01$), ocorrida ao quinto dia de avaliação, apresentou os maiores índices nos tratamentos 3 e 6, com médias de 65 e 70% e o tratamento 4 com o menor índice igualando-se a testemunha com 20% de sementes emergidas (Tabela 4).

O índice de emergência (EM) não apresentou diferenças significativas em relação aos tratamentos analisados. Os tratamentos 3 e 6 apresentaram valores médios de 67,5 % e 77, 5% de sementes emergidas e o tratamento 4 foi semelhante a testemunha com 32,5%. Os tratamentos em contato com o Manitol apresentaram os maiores índices de emergência (EM), onde provavelmente o manitol induziu positivamente a germinação e emergência das sementes de feijão fava analisadas.

Apesar de encontrar-se incidência significativa de *Fusarium* spp. na sanidade em sementes de feijão fava, nem sempre significa que todos os isolados sejam patogênicos. Summerell et al., (2003) consideram que dentre as espécies de *Fusarium* spp. pode estar presente uma espécie saprófita, dentre os diversos complexos de espécie existentes no gênero, necessitando de procedimentos de inoculação para definir sua patogenicidade.

As plantas emergidas e inoculadas com o patógeno, apresentaram sintomas de amarelecimento e murcha somente no estágio inicial de plântula, ou os sintomas de murcha ficaram restritos somente ao cotilédone. À partir do desenvolvimento da folha verdadeira, os sintomas desapareceram visualmente, podendo ser encontrados em algumas plantas, necrose na raiz primária e escurecimento vascular ao vigésimo primeiro dia de observação (Figura 3).



Figura 3. Plantas de feijão fava ao vigésimo primeiro dia após inoculação com *Trichoderma* e *Fusarium* spp. A, C) Necrose desenvolvendo-se na raiz primária (indicada por seta); B, D) Escurecimento vascular observado após o corte de feixe vascular (indicado por seta).

Não foi possível observar progressão dos sintomas sobre as plantas de feijão fava, provavelmente devido ao tempo de exposição ao patógeno *in vitro* durante a inoculação ou ao tempo de exposição após a inoculação em casa de vegetação. Sousa (2016) ao inocular *F. falciforme* em plântulas de feijão fava, realizou avaliações até o sexagésimo dia. Pereira (2007) define que o intervalo mínimo para observar o progresso de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro comum, é de 21 dias. Neste trabalho observou-se as plantas até o vigésimo primeiro dia causando, provavelmente interferência na reprodução dos sintomas desejados.

Veloso (2013), testando isolados de *F. oxysporum* em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), não observou sintomas em todos os isolados analisados. Verificando que estas espécies constituíam-se de saprófitas que permanecem aderidas a camada superficial da semente e inviabilizavam o desenvolvimento do patógeno durante a inoculação.

Carvalho (2011), para o feijoeiro, verificou que nos dias iniciais de inoculação a incidência do patógeno foi mais elevada, e a partir do nono dia, com o maior desenvolvimento, observou-se um percentual mais elevado de plântulas normais, como também foi notado neste trabalho.

O efeito não positivo de *Fusarium* spp. pode ser atribuído também ao inóculo com o *Trichoderma* spp. que com os princípios de competição, podem ter inviabilizado as colônias do patógeno à partir da produção de metabólitos extracelulares tóxicos para outros fungos conforme relata Harman et al., (2004).

Como constata Redda et al., (2018) utilizando isolados de *Trichoderma*, obtiveram redução significativa da incidência do patógeno *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* em plântulas de pepino (*Cucumis sativus*). Tendo em vista a evolução de práticas culturais, condições ambientais e alta variabilidade do patógeno, podem ocorrer a co-evolução do patógeno com o hospedeiro, influenciando seu ciclo biológico, incluindo sua capacidade causar doença (TU, 1994).

5.4 Avaliação fisiológica *in vitro* e *in vivo* sobre o tratamento do *Trichoderma*

A qualidade fisiológica de sementes é importante para a avaliação das variáveis de desempenho, como emergência, emergência total de plântulas, viabilidade e manutenção de alto vigor, favorecendo uma maior velocidade nos processos metabólicos, propiciando emissão mais rápida e uniformidade da raiz primária durante o processo de germinação, alta taxa de crescimento, produzindo plântulas com maior tamanho inicial e alta produtividade (MUNIZZI et al., 2010).

Na interação entre antagonista *versus* concentrações, as suspensões de $1,5 \times 10^8$; $2,0 \times 10^8$; $2,5 \times 10^8$ e $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} , para o *Trichoderma* spp., não influenciaram significativamente na qualidade fisiológica *in vitro*, quando avaliados os índices de velocidade de germinação (IVE), primeira contagem de germinação (PCG) e germinação (GE) nas sementes de feijão fava, não diferindo estatisticamente da testemunha (Figura 4).

Para o Trichodel[®], foi observado efeito fitotóxico para as plântulas de feijão fava nas concentrações analisadas, exceto na concentração $2,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} , que apresentou médias próximas a testemunha quanto ao IVG, PCG e GE. Em relação as demais doses, índices inferiores foram observados em relação à testemunha, sendo a concentração de $1,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1} apresentando os menores valores fisiológicos. Dados semelhantes foram observados por Faria et al.(2003) analisando a ação de *T. harzianum* sob sementes de algodoeiro.

O teste de germinação foi realizado em condições controladas sob condições de umidade e temperaturas constantes, podendo assim ter influenciado no vigor das sementes. Gomes et al. (2016), observaram resultados semelhantes para as variáveis de qualidade fisiológica em sementes de feijão fava tratadas com diferentes óleos essenciais. Tais resultados podem sugerir que o feijão fava, devido ao seu caráter rústico, necessita de condições adversas de temperatura e umidade, não se comportando de maneira expressiva em testes *in vitro*. Segundo Harman (2004) os efeitos de *Trichoderma* são mais evidentes durante condições mais adversas e estressantes.

Os mesmos tratamentos foram aplicadas para avaliação da qualidade fisiológica *in vivo* das sementes de feijão fava, em casa de vegetação. Não houve interação significativa para a variável de índice de velocidade de emergência (IVE) (Figura 4). O isolado de *Trichoderma* spp., foi observado os maiores índices nas concentrações de $1,5$; $2,0$ e $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} , apresentando uma maior velocidade de emergência em comparação com a testemunha, ao nível de significância de 5%.

A concentração $2,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1} para ambos tratamentos apresentou os menores índices, além disso, para o tratamento *Trichoderma* spp. houve interação negativa na emergência de plântulas de feijão fava. Para o Trichodel[®], nas concentrações de $1,5$; $2,0$ e $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} os valores médios foram superiores a testemunha. Santin (2008) registrou a ocorrência de interação negativa de *Trichoderma* em sementes de feijoeiro, devido a produção de metabólitos tóxicos a semente ou a competição por nutrientes com a plântula. É importante ressaltar que a ação promotora de *Trichoderma* é relatada por diversos autores na literatura, constituindo-se de raros relatos de efeitos negativos.

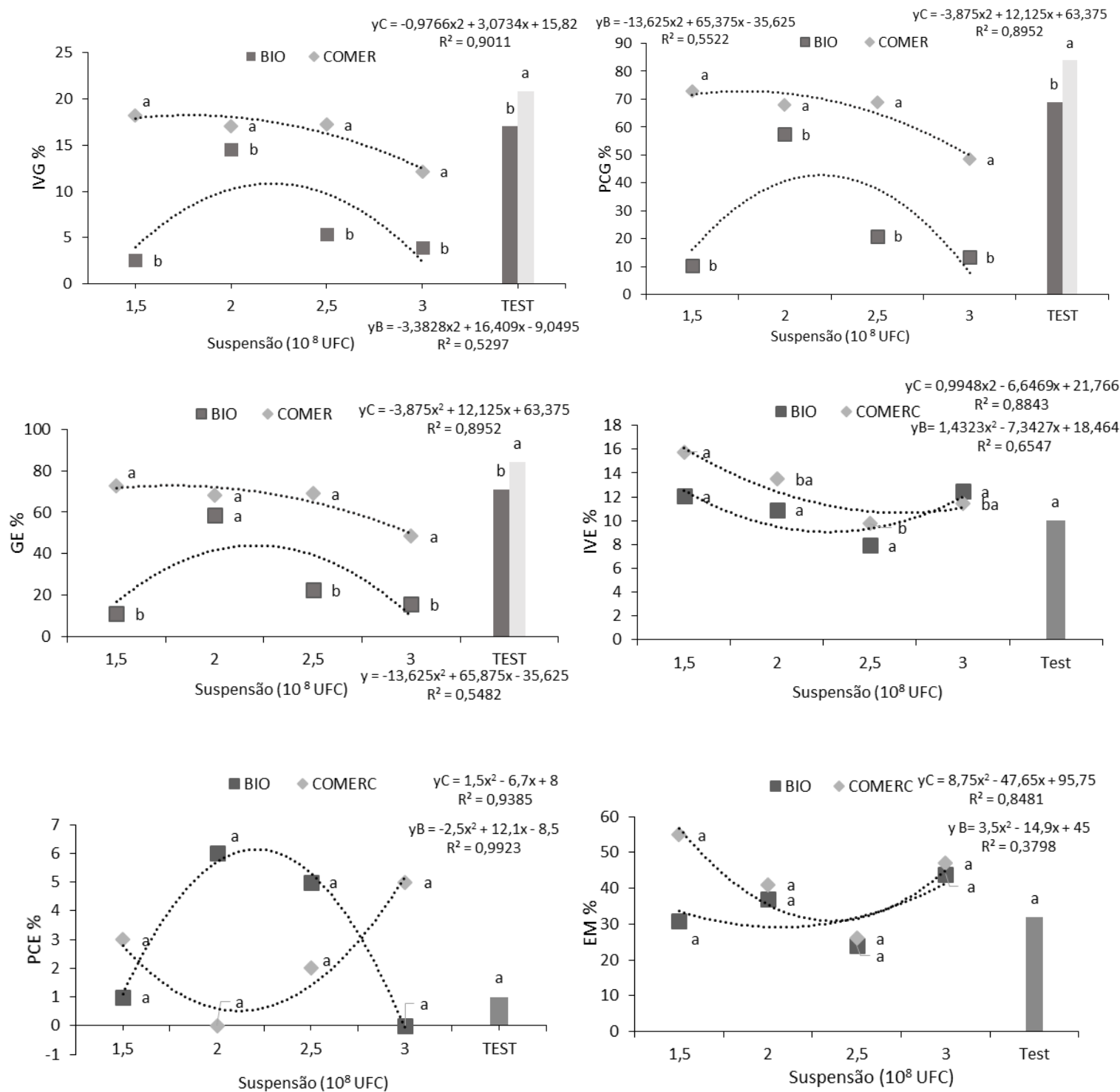


Figura 4. Controle biológico com *Trichoderma* de sementes de feijão fava ‘Orelha de Vó’. Índice de velocidade de germinação (IVG), primeira contagem de germinação (PCG) e germinação (GE), porcentagem de plântulas de feijão fava ‘Orelha de Vó’ emergidas na primeira contagem (PCE), emergência (EM) e índice de velocidade de emergência (IVE), sob suspensão em diferentes concentrações de *Trichoderma*.

Para a variável de primeira contagem de emergência (PCE) não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha (Figura 4), porém, as concentrações de $2,0$ e $2,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1} do tratamento com *Trichoderma* spp. apresentaram índices superiores. Já a concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} do tratamento com *Trichoderma* spp., apresentou índices inferiores a testemunha, porém nesta mesma concentração, para o isolado Trichodel[®], os índices foram superiores.

Os valores médios de emergência (EM) não diferiram estatisticamente entre os tratamentos, entretanto, nas concentrações de $1,5$; $2,0$ e $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} , para ambos os tratamentos apresentou percentual de emergência superiores à testemunha (Figura 4). Os resultados corroboram com Berloff et al., (2015), as sementes de angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*) tratadas com *T. asperellum* apresentaram uma melhor emergência, porém, não houve diferença estatística entre os demais tratamentos.

Para o comprimento da parte aérea (CPA) houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$) (Figura 5) com efeito sinérgico entre as concentrações de $1,5$; $2,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} para o tratamento com *Trichoderma* spp. e na concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} para ambos os tratamentos, que proporcionaram os mais altos índices em relação às demais concentrações e a testemunha. O Trichodel[®] na concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} e o *Trichoderma* spp. na concentração de $2,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1} apresentaram médias inferiores à testemunha.

Em relação ao comprimento de raiz (CPR) houve diferença significativa ($p < 0,01$) na interação antagonista *versus* concentrações. O Trichodel[®] apresentou valores superiores a testemunha em todas as concentrações, e a maior concentração proporcionando plântulas mais vigorosas, como também um maior desenvolvimento de raízes laterais (Figura 5). Para o tratamento com *Trichoderma* spp., não houve interação significativa entre antagonista *versus* concentrações *versus* testemunha.

Houve interação significativa ao nível de probabilidade à 1% entre antagonista *versus* concentrações *versus* testemunha para os índices de comprimento de plântulas (CPL) (Figura 5), onde o tratamento com *Trichoderma* spp. na concentração de $2,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} apresentou o maior índice do tratamento sendo superior à testemunha, no comprimento total de plântulas. A concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios mL^{-1} proporcionou um maior comprimento de plântulas

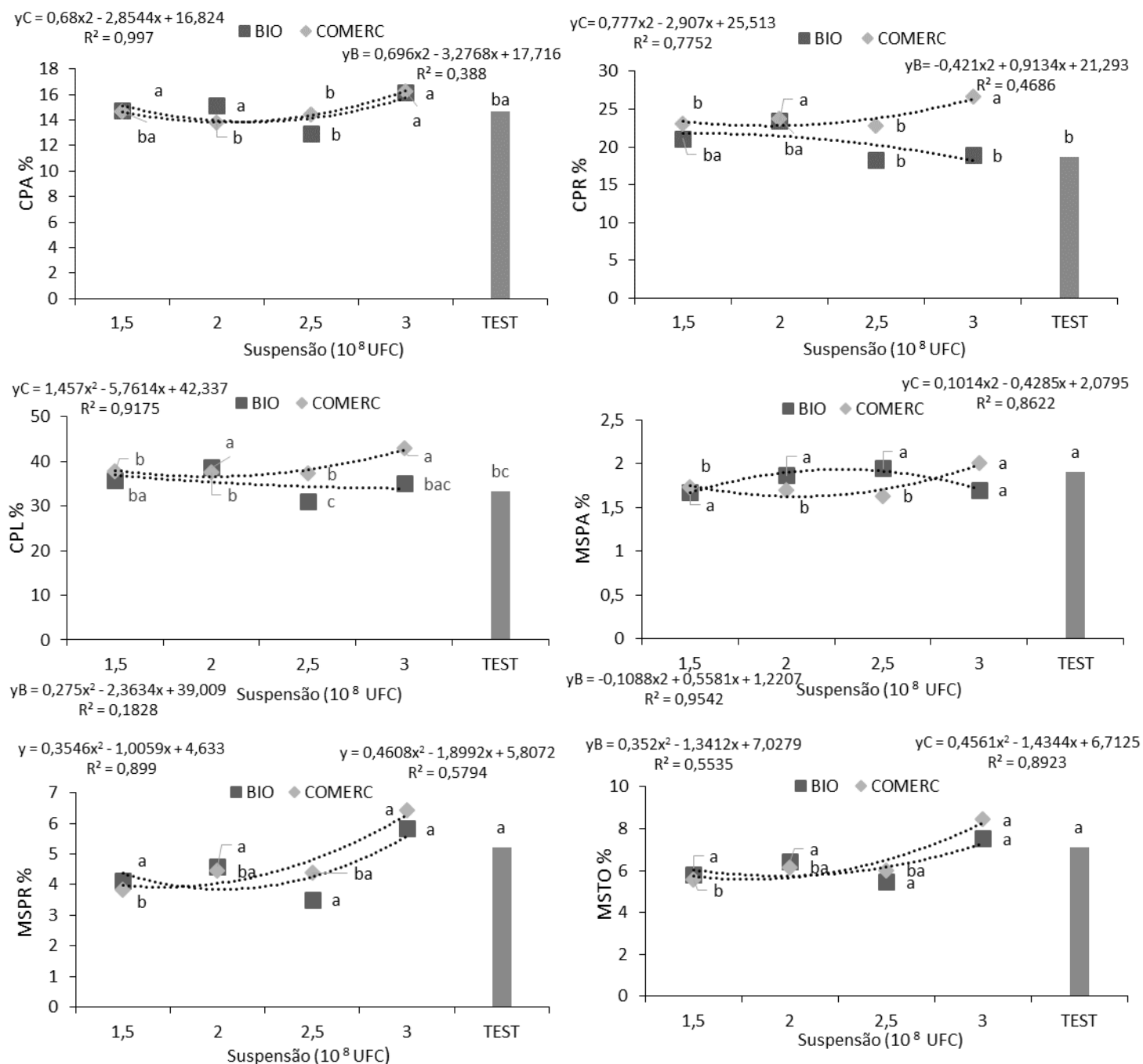


Figura 5. Comprimento (cm) da parte aérea, raiz primária e plântula de feijão fava ‘Orelha de Vó’. Massa seca (g) da parte aérea, raiz e plântula de feijão fava, tratadas sob diferentes suspensões de *Trichoderma*.

Em *Arabidopsis thaliana*, relatou-se que *Trichoderma virens* proporcionou o aumento da biomassa das raízes e da formação de raízes laterais, associando tal crescimento, com a produção de auxinas pelo fungo. Além disso, induziu a acumulação de peróxido de hidrogênio nas raízes primárias e nas raízes laterais (CONTRERAS-CORNEJO, 2011). Chaves (2015), avaliando a qualidade de plantas de alface (*Lactuca sativa*) inoculadas com *Trichoderma* no substrato, observou que para as variáveis de comprimento de plântula (CPL) e para comprimento de raiz (CPR) houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos na interação cultivar x *Trichoderma* e testemunha, porém, para um das cultivares analisadas não houve significância para o comprimento de raiz.

Carvalho et al. (2011) avaliando o crescimento de plantas de feijoeiro sob tratamento de *T. harzianum*, verificou que nenhum dos tratamentos foi superior à testemunha para o comprimento de parte aérea (CPA). Para comprimento médio de raízes, apenas um dos tratamentos foi superior à testemunha, apresentando em um dos tratamentos necroses na raiz derivadas da interação do antagonista.

Patekoski et al., (2016) ao avaliarem ação do produto Trichodel[®], não observaram promoção de crescimento e nas concentrações testadas de 0,5 e 1 mL L⁻¹ ocorreu-se a redução do comprimento de raiz das plantas analisadas.

O peso de massa seca parte aérea (MSPA) apresentou níveis significantes a 1%. O Trichodel[®] na concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹, proporcionou o maior valor médio entre os tratamentos e a testemunha. O menor valor entre os tratamentos e a testemunha foi apresentado pela concentração de $2,5 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ (Figura 5).

Para a massa seca da raiz (MSPR) houve significância à 5% entre aos tratamentos. Os maiores valores entre os tratamentos foram proporcionados na concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹, entretanto, não houve diferença estatística para as concentrações entre a testemunha (Figura 5). Nas demais concentrações, em ambos tratamentos, os valores médios foram inferiores a testemunha. Chaves (2015), observou interação significativa do *Trichoderma* para as variáveis de massa seca de raiz, total e parte aérea em mudas de alface (*Lactuca sativa*).

Na variável da massa seca total (MSTO), houve significância à 5% entre os tratamentos. Sendo os maiores valores proporcionados na maior concentração entre os tratamentos, não diferindo estatisticamente da testemunha (Figura 5). Berloff et al.

(2015) apresentaram dados semelhantes para as variáveis de massa seca em casa de vegetação, para mudas de angico vermelho, não havendo diferenças significativas.

Para Harman et al. (2004), a característica de promotor de crescimento de *Trichoderma* sp. o torna importante para a agricultura. Entretanto, no presente trabalho não foi possível observar efeitos significativos de promoção de crescimento para as variáveis de massa seca (MSPA, MSPR e MST), porém, para as variáveis de crescimento (CPA, CPR e CPL) os tratamentos se mostraram promissores para as concentrações testadas.

O percentual de sementes mortas (SM) não apresentou significância nos tratamentos. Já o índice de sementes duras (SD) apresentou significância à 5% entre os tratamentos. Na concentração de $2,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1} no tratamento com Trichodel®, houve o maior índice de sementes duras, podendo ter ocasionado um perda de vigor nas sementes, que mesmo viáveis não emergiram do substrato (Figura 6) O tratamento com *Trichoderma* spp., apresentou os menores índices de sementes duras, até mesmo para a testemunha, não apresentando perda de vigor nas sementes.

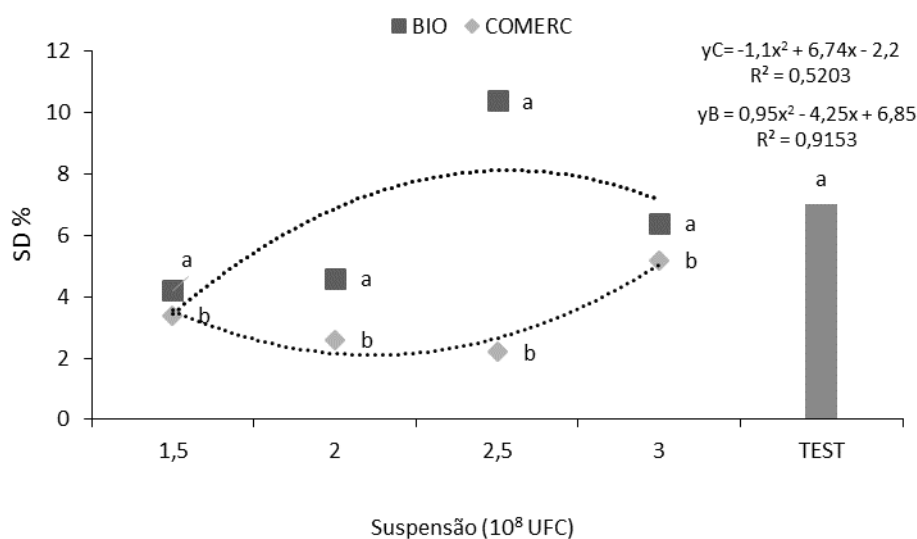


Figura 6. Porcentagem de sementes duras (SD) germinadas, porém não emergidas quando submetidas à diferentes concentrações de *Trichoderma*.

5.5 Análise sanitária das sementes de feijão fava

A boa qualidade da semente representa um dos elementos para o sucesso de uma lavoura, na qual todas as práticas agrícolas, incluindo principalmente o controle fitossanitário não serão eficazes caso ocorra o uso de sementes com baixa qualidade. Uma semente de boa qualidade física e sanitária é um aspecto a ser considerado devido

a presença de microrganismos causando perdas na agricultura e transmitindo doenças entre diferentes regiões (NASCIMENTO; MEDEIROS, 2015).

O lote oriundo da cidade de Remígio-PB, apresentou os seguintes gêneros fúngicos com maior incidência: *Aspergillus* spp. (25,5%); *Colletotrichum* sp. (0,2%); *Chaetomium* sp. (0,2%); *Fusarium* spp. (1,1%); *Penicillium* sp. (13,3%); *Rhizopus* sp. (8,5%). O lote de Alagoa Grande-PB apresentou os gêneros fúngicos: *Aspergillus* spp (0,2%); *Colletotrichum* sp. (0,2%); *Curvularia* sp. (0,1%); *Chaetomium* sp. (0,2%); *Fusarium* sp. (4,6%); *Penicillium* sp. (3,9%); *Rhizopus* sp. (0,3%). E o lote de Campina-PB: *Aspergillus* spp. (6%); *Colletotrichum* sp. (0,1 %); *Chaetomium* sp. (0,3%); *Fusarium* sp. (4,7%); *Penicillium* sp. (8,6); *Rhizopus* sp. (1,8%) (Tabela 5).

Tabela 5. Incidência de fitopatógenos associados à sementes de feijão fava ‘Orelha de Vó’ para os lotes analisados de Remígio-PB, Alagoa Grande-PB e Campina Grande-PB.

LOTES %			
Gêneros %	Remígio-PB	Alagoa Grande –PB	Campina Grande-PB
<i>Curvularia</i> sp.	-	0,1	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	0,2	0,2	0,1
<i>Chaetomium</i> sp.	0,2	0,2	0,3
<i>Periconia</i> sp.	0,4	-	-
<i>Fusarium</i> spp.	1,1	4,6	4,7
<i>Rhizopus</i> sp.	8,5	0,3	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	13,3	3,9	8,6
<i>Aspergillus</i> spp.	25,5	0,2	6

As sementes oriundas de Remígio demonstraram uma alta incidência de fungos de armazenamento, como *Aspergillus* spp. (25,5%), *Penicillium* sp. (13,3%), *Rhizopus* sp. (8,5%), podendo-se inferir que as condições nas quais as sementes estavam armazenadas não eram ideais, seja de tempo, temperatura e umidade. Já os lotes de Alagoa Grande e Campina Grande, demonstraram menores incidências de fungos de armazenamento e uma maior incidência de *Fusarium* spp. (4,6% e 4,7%, respectivamente). O lote de Remígio, por apresentar uma qualidade inferior às outras amostras obtidas, houve incidência menor de *Fusarium*, que segundo Querales (2010), a viabilidade do patógeno é reduzida em consonância com o tempo de armazenamento.

Gomes et al. (2016), registraram a incidência de patógenos e fungos de armazenamento em feijão fava variedade “lavandeira”, dentre os gêneros de maior importância *Fusarium*; *Aspergillus*; *Rhizopus*; e *Penicillium*, encontrados em comum neste trabalho.

Mota et al. (2017), analisaram a incidência de fitopatógenos em feijão fava e detectaram a existência de 22 gêneros de fungos associados às sementes, correspondendo de maior incidência aos gêneros *Aspergillus*; *Penicillium*; *Curvularia* e *Monilia* em 63,76% de todas as colônias fúngicas obtidas.

Os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*, são responsáveis pela deterioração de sementes, em condições de armazenamento inadequado, atacando sua reserva, e com isso reduzindo seu vigor, índice germinativo e podendo levar a morte do embrião (EMBABY et al., 2013; SOUZA et al., 2017).

O gênero *Fusarium*, foi encontrado por Mota et al., (2017) em 22 acessos das sementes analisadas de feijão fava, registrando 64,7% de incidência, e apresentando variação intraespecífica, como *Fusarium camptoceras*, *Fusarium clamydosporium* e *Fusarium verticillioides*.

A incidência de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* em sementes é problemática, principalmente no que se refere a produção de micotoxinas, que podem ser prejudiciais ao consumo animal e humano. Além disso, *Fusarium* spp. pode inibir a germinação de diversas outras culturas e ser facilmente transmitido para plântulas. São necessários estudos que suportem o estabelecimento de padrões sanitários de sementes para estas espécies toxigênicas e gerar evidências científicas sobre a relevância de sua transmissão sistêmica à planta e o impacto no acúmulo de toxinas no grão (QUERALES, 2010; DEAN et al., 2012; PARSA et al., 2016).

Os resultados da análise de sanidade deste trabalho revelam um índice preocupante, pois os maiores índices de produção de feijão fava ainda são restritos a pequenos produtores, que majoritariamente não detém de técnicas adequadas de armazenamento e produção, necessitando de uma maior atenção dos órgãos de fiscalização e de pesquisa e extensão.

5.6 Caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium*

A caracterização morfológica é tradicionalmente utilizada para fins taxonômicos e envolve análise de pigmentação das colônias, textura, forma marginal, velocidade de crescimento micelial, processo de formação dos conídios, forma e tamanho de esporos (BURGESS et al., 1995).

Os isolados avaliados apresentaram uma significativa variabilidade morfológica para todas as variáveis avaliadas. As culturas produziram micélio flocoso, esparsos ou denso irregular, tingidos pelo substrato no verso e reverso da placa de Petri de violeta-claro, amarelo-claro, branco-rosado, branco, violeta acinzentado, violeta escuro, branco-amarelado, branco acinzentado, rosa-púrpura, amarelo-escuro e laranja-salmão observados em BDA (Figura 7). Tais características, são consideradas secundárias e atualmente não são tão utilizadas para classificação taxonômica, devido às constantes variações exibidas por este gênero (Querales, 2010), porém, são de grande importância para a caracterização morfológica das culturas fúngicas.

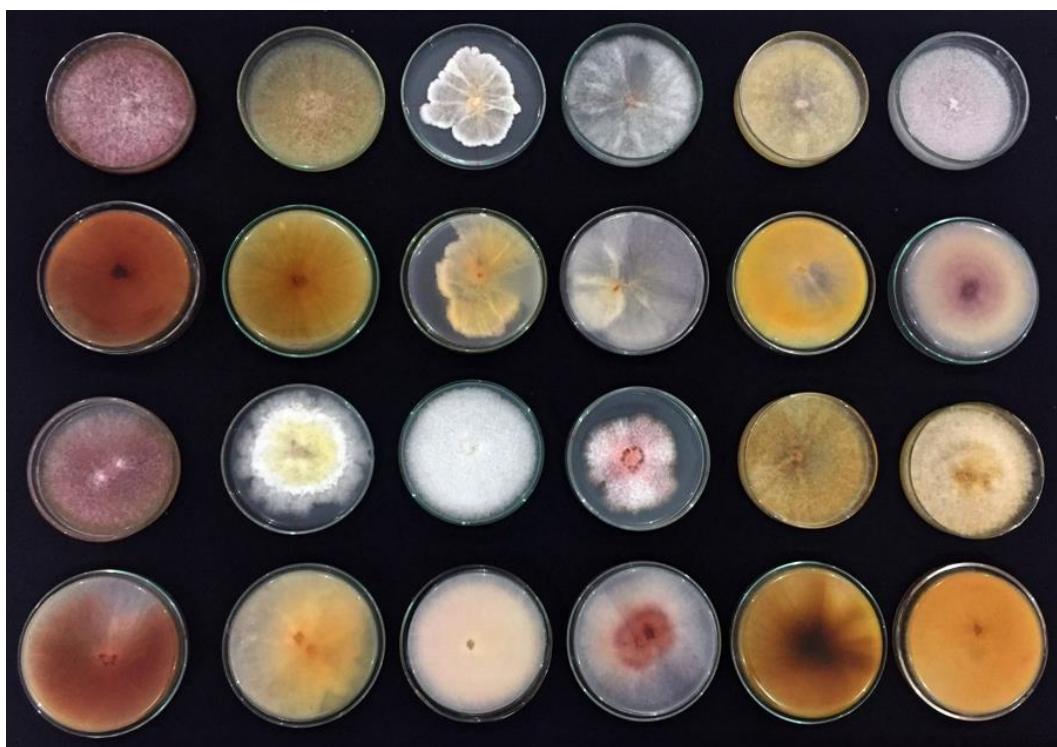


Figura 7. Colônias de *Fusarium* spp. em meio batata-dextrose-ágar. Cada par do verso e reverso das placas estão dispostos alinhados em colunas.

Microconídios hialinos produzidos em falsas cabeças e formando longas cadeias, micronídios ovais à obovóides, clavados, ovais com um septo transversal, piriformes e globosos, macroconídios elipsóides à fusiformes produzidos em células conidiogênicas por mono ou polifiálides; foram observados em meio SNA (Figura 8).

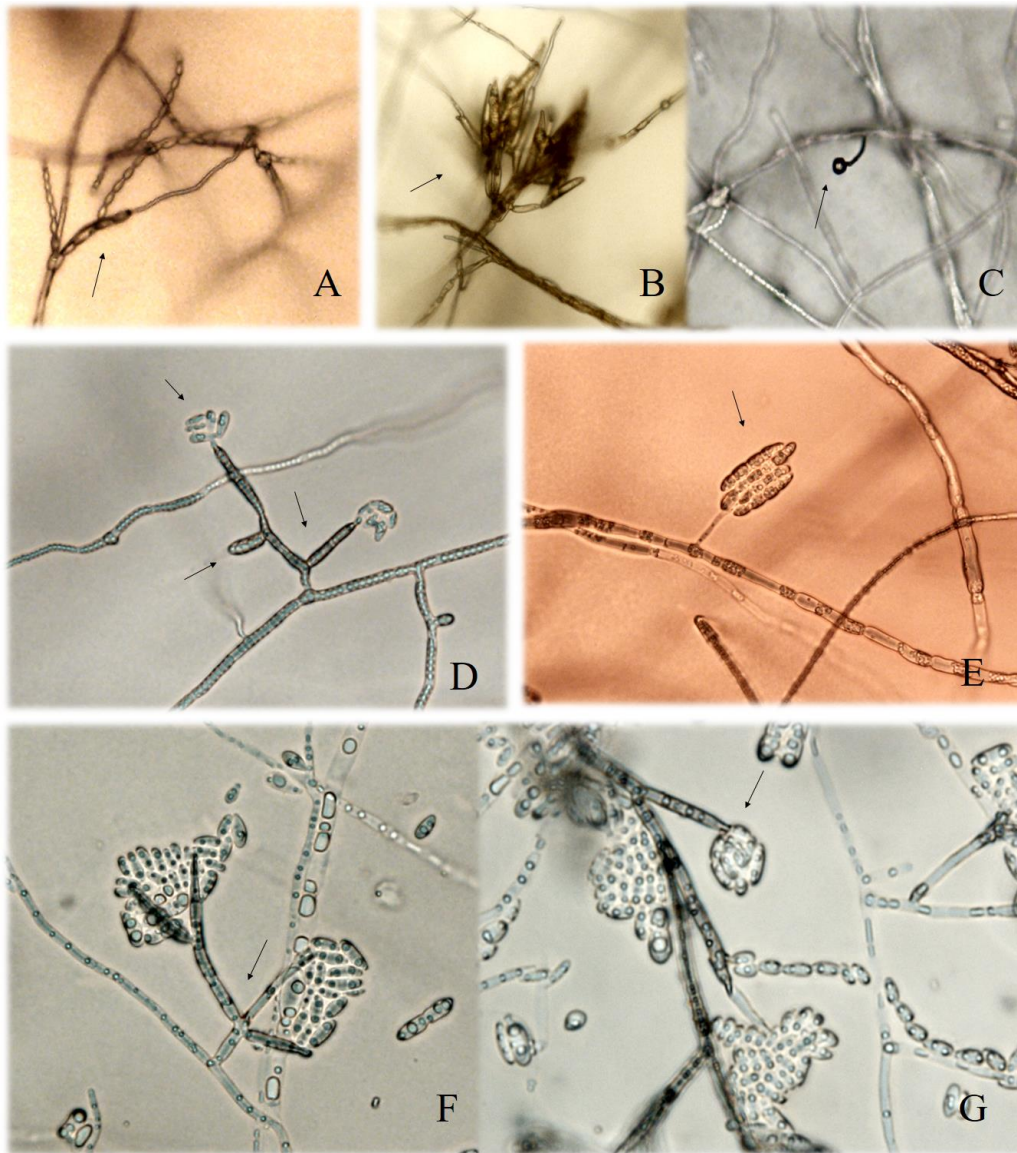


Figura 8. Características morfológicas de *Fusarium* spp. do feijão fava em meio SNA. A) micronídios produzidos sobre falsas cabeças e formando cadeias longas >15 conídios (aumento de 20x); B) esporodóquio produzindo macroconídios (aumento de 40x); C) monofiálides produzindo microconídio em falsa cabeça (aumento de 40x); D) polifiálides (indicado pela seta central) produzindo microconídios em massa sobre falsas cabeças (aumento de 40x); E) macroconídios sendo produzidos; F) polifiálides produzindo microconídios; G) monofiálide produzindo microconídios em cadeia e em massa sobre falsas cabeças (aumento de 40x).

Os clamidósporos são normalmente encontrados em culturas mais velhas, originando de hifas ou conidióforos, sendo necessário reexaminar as culturas após um certo período de tempo (SUMMERELL et al., 2003). As culturas foram observadas após o vigésimo primeiro dia e foi constatada a presença de clamidósporos (Figura 9) apenas nos isolados CMLF 01, CMLF 08 e CMLF 09, com formato globoso oval do tipo solitário, ou ocorrendo em pares, e em cadeia com coloração alaranjada, intercalados ou formados nas extremidades das hifas. Esta estrutura é típica do gênero *Fusarium*, entretanto, as espécies do complexo *Giberella fujikuroi* não a produzem. A ausência de clamidósporo, aliada a produção de esporodóquios de coloração alaranjada, a presença de macroconídios com paredes delgadas e microconídios abundantes dispostos em falsas cabeças são características chaves deste complexo, mostrando ser uma característica importante à ser avaliada nos isolados deste trabalho (NELSON, 1983; QUERALES, 2010).

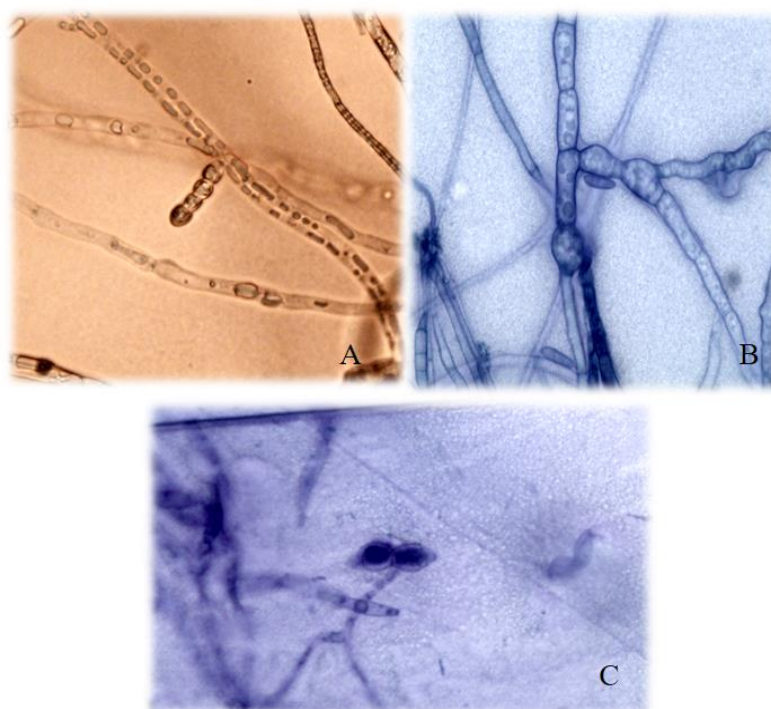


Figura 9. Tipos de clamidósporos dos isolados de *Fusarium* spp. do feijão fava em SNA à partir do vigésimo primeiro dia de cultivo. A) Clamidósporo em cadeia produzido na extremidade da hifa (aumento de 40x); B) Clamidósporo intercalado a hifa (coloração à partir de azul de metileno, aumento de 100x); C) Clamidósporo duplo (coloração à partir de azul de metileno, aumento de 100x).

Os microconídios asseptados, mais abundantes que os macroconídios, para a maioria dos isolados apresentaram-se hialinos, sendo produzidos em falsas cabeças e

produzidos em monofiálides curtas formando cadeias longas e curtas, possuindo em média de 3,0 µm de comprimento e 1,0 µm de largura (Tabela 6). Alguns isolados apresentaram microconídios septados, possuindo em média 4 µm de comprimento e 1,0 µm de largura, binucleados à partir do septo; estas estruturas assemelham-se a ascósporos no período pré-germinativo conforme descrito por Lima (2006), porém, não foi observado a presença de peritécios nos isolados em questão.

Tabela 6. Características morfológicas(µm) de isolados de *Fusarium*. UFPB, Areia, PB, 2018.

<i>Fusarium</i> spp.	Macroconídios septados		Microconídios septados		Microconídios asseptados		Fiálides	
	C	L	C	L	C	L	C	L
CMLF 01	13,1 a	1,2 b	5,4 a	1,3 a	0 c	0 c	8,5 a	1,1 cb
CMLF 02	0 d	0 c	0 c	0 c	3,1 b	1,2 b	11,4 a	1,42 cb
CMLF 03	10,2 ba	1,3 b	0 c	0 c	3,0 b	1,3 ba	10,5 a	1,09 cb
CMLF 04	0 d	0 c	0 c	0 c	3,0 b	1,5 a	10,7 a	0,87 cb
CMLF 05	0 d	0 c	0 c	0 c	3,6 a	1,4 ba	16,2 a	1,17 cb
CMLF 06	5,52 c	1,2 b	3,6 b	0,67 b	0 c	0 c	11,1 a	0,98 cb
CMLF 07	7,4 bc	1,2 b	0 c	0 c	3,4 ba	1,2 b	9,1 a	1,25 cb
CMLF 08	12,7 a	1,7 a	4,1 b	0,8 b	0 c	0 c	11,8 a	2,43 a
CMLF 09	7,7 bc	1,4 b	4,1 b	1,5 a	0 c	0 c	8,2 a	1 cb
CMLF 10	8,4 bc	1,1 b	3,8 b	0,9 b	0 c	0 c	9,2 a	1,5b
CV. %	31,9	19,1	34,1	41,2	18,9	33,5	84,7	31,4

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os macroconídios produzidos foram multinucleados fusiformes, levemente curvados a quase retos, de paredes delgadas em média de 5,0 µm até 13,0 µm de comprimento e 1,5 µm de largura, e possuindo de 1-6 septos, sendo mais frequente encontrar de 1-4 septos, sendo de fácil identificação pelas dimensões apresentadas (Tabelas 6,7). Foi possível observar a formação de esporodóquios produzindo macroconídios apenas no isolado CMLF 01, à partir do vigésimo primeiro dia de cultivo e apresentando coloração alaranjada, característica também descrita por Veloso (2013) em isolados de *F. oxysporum* do feijão-caupi.

Tabela 7. Marcadores morfológicos diferenciais de *Fusarium* spp., isolados de sementes de feijão fava. UFPB, Areia, PB, 2018.

<i>Fusarium</i> spp.		01	02	03	04	05	06	07	08	09	010
Arranjo dos conídios	Falsas cabeças	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
	Cadeias curtas (<15 conídios)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cadeias longas (>15 conídios)	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Hifa estéril espiralada		-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Classificação conídios	Oval à obovoide	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	Piriforme	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Clavado	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	Fusifforme	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	Globo	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Abert. con.	Máx	4	4	2	2	3	4	3	1	-	4
Clamidósporos		+	-	-	-	-	-	-	+	+	-

(+) indica a presença do caractere;

(-) indica a ausência do caractere;

Atualmente, devido as constantes mudanças intraespecíficas apresentadas por *Fusarium*, a identificação de espécie por caracteres morfológicos não é utilizada com frequência na literatura. Porém, manuais de identificação morfológica ainda são utilizados para fins de comparação estruturais, como os descritos por Leslie e Summerell (2006).

Os isolados de *F. oxysporum* e *F. incarnatum* descritos por Pizzeta (2017), apresentaram fortes semelhanças morfológicas entre alguns isolados descritos neste trabalho. A semelhança na forma e disposição de micro e macroconídios, originados em mono e polifiálides, além da coloração de colônias foi evidente. Tal fato sugere uma aproximação morfológica entre os isolados de *Fusarium* spp. deste trabalho.

A diversidade de características apresentadas pelos conídios (Figura 10) entre os isolados, sugerem que possa existir diferentes espécies ou agrupadas em complexos

entre os dez isolados descritos. A confirmação por marcadores moleculares é essencial na próxima etapa de identificação das culturas.

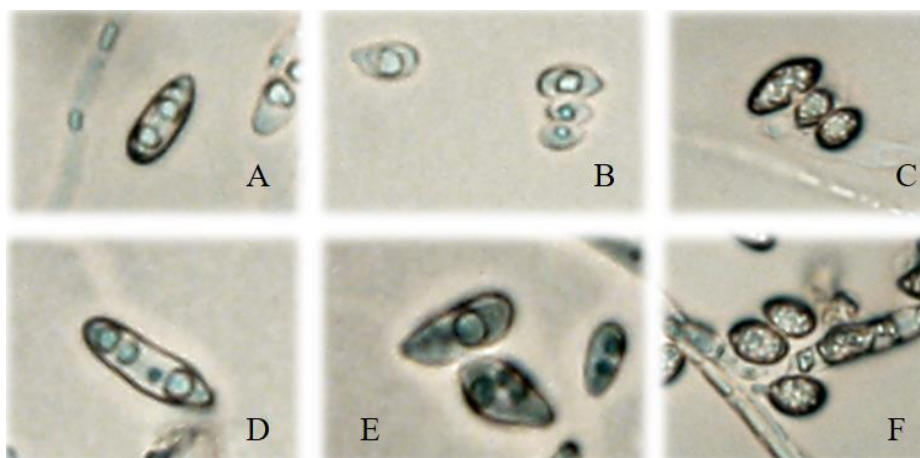


Figura 10. Morfologia de microconídios observadas nos isolados de *Fusarium* spp. (aumento de 40x); A) Microconídio oval; B) Microconídio piriforme; C, F) Microconídio globoso; D) Microconídio clavado; E) Microconídio obovoide.

O índice de velocidade de crescimento micelial das colônias (IVCM) foi avaliado diariamente (Tabela 8), acondicionados em estufa BOD em $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Os isolados apresentaram um bom índice de crescimento micelial, variando de uma cultura para outra. O isolado que apresentou o crescimento médio mais significativo foi o CMLF 08 com $17,63 \text{ mm dia}^{-1}$, com os isolados CMLF 01, CMLF 06, apresentando índices respectivos de $16,28 \text{ mm dia}^{-1}$ e $15,73 \text{ mm dia}^{-1}$. Os isolados CMLF 02 e CMLF 04 apresentaram os menores índices de crescimento micelial analisados, de $10,40 \text{ mm dia}^{-1}$ e $12,38 \text{ mm dia}^{-1}$.

Tabela 8. Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação (UFC 1×10^4) e pigmentação das colônias em meio BDA para os isolados analisados. UFPB, Areia, PB, 2018.

			PIGMENTAÇÃO DA COLÔNIA	
<i>Fusarium spp.</i>	IVCM	UFC 1×10^4	VERSO	REVERSO
CMLF 01	16,28 ba	4,7 cd	Salmão	Laranja salmão
CMLF 02	10,40 e	17 cbd	Rosa Púrpura	Rosa Púrpura
CMLF 03	13,19 cd	129,75 a	Violeta acinzentado	Violeta claro
CMLF 04	12,38 ed	27,65 cbd	Branco	Branco
CMLF 05	14,59 bcd	36,6 b	Violeta escuro	Vermelho claro
CMLF 06	15,73 ba	2,4 d	Branco	Branco
CMLF 07	12,99 cd	35,65 cb	Branco rosado	Salmão
CMLF 08	17,63 a	13,8 cbd	Salmão	Laranja Salmão
CMLF 09	13,19 cd	3,1 d	Branco Amarelado	Salmão
CMLF 10	15,10 bc	1,05 d	Salmão	Laranja Salmão
CV. %	7,5	68,22		

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Apesar do IVCM constituir-se de uma característica comparativa dentre os isolados analisados, Pizzeta (2017) registrou médias de crescimento semelhantes a este trabalho, onde 12,0 mm dia⁻¹ para os isolados de *F. oxysporum* e de 14,5 mm dia⁻¹ para os isolados de *Fusarium incarnatum*. Veloso (2013), encontrou índices de 11 mm dia⁻¹ para isolados de *F. oxysporum* associados ao feijoeiro.

Os níveis de esporulação (Tabela 9) foram analisados com auxílio da câmara de Neubauer, sob uma solução de 10 ml e ajustados para a concentração 1×10^4 conídios mL⁻¹. O isolado que apresentou esporulação mais significativa foi o CMLF 03, e o isolado com o menor índice de esporulação foi o isolado CMLF 010.

Segundo Summerell et al. (2003), uma das caracteres taxonômicos do gênero *Fusarium* é a presença das fiálides, hifas produtoras de esporos, que dividem-se em monofiálides e polifiálides. As monofiálides apresentam apenas uma abertura para a célula conidiogênica, as polifiálides apresentam duas ou mais. Para tal, as aberturas conidiogênicas foram descritas na Tabela 8, que apresentaram origem em mono e polifiálides. Em geral, as fiálides não apresentaram diferenças estatísticas entre si para comprimento, alcançando em torno de 16 μ m de comprimento e até 2,43 μ m de largura.

Foi detectada a presença da hifa estéril espiralada associada ao conidióforo, aparecendo na superfície do meio SNA nos isolados CMLF 02, CMLF 06 e CMLF 07 (Figura 12). A hifa estéril espiralada é característica de espécies de *Fusarium* associadas ao complexo *Gibberella fujikuroi* (NIRENBERG; O'DONNEL, 1998).



Figura 11. Hifa estéril espiralada observada nos isolados de *Fusarium* spp. (coloração à partir de azul de metileno, aumento de 100x).

Pérez-Sierra (2007) descreve a presença da hifa estéril espiralada em um isolado e no outro uma hifa estéril não espiralada, associada à *Fusarium circinatum* patógeno de *Pinus* spp. no norte da Espanha. Pfenning et al. (2014) registram a primeira ocorrência de *F. circinatum* no Brasil associado também ao *Pinus* e apresentando também a hifa estéril espiralada. *F. circinatum* também foi associado à espécies de gramíneas próximas à hospedeiros de *Pinus* na Califórnia, mostrando que tal patógeno pode infectar gramíneas sem demonstrar sintomas visíveis (SWETT, 2012).

Lima (2006), observou a presença da hifa estéril espiralada nos isolados de *Fusarium* sp. do Brasil e em *Fusarium sterilihyphosum* associados à mal formação da mangueira, sendo este último relatado pela primeira vez no Brasil. É portanto, um caractere taxonômico de extrema importância para o gênero, onde estudos moleculares podem confirmar a espécie associada ao feijão fava na qual tais estruturas estão presentes. Tendo em vista às formas de produção de feijão fava, que geralmente é posta

como cultura marginal associada à gramíneas na mesma área de cultivo, pode vir à ocorrer, de fato, a mistura de material genético de patógenos, causando a disseminação de doenças e aumentando a sua variabilidade.

A caracterização morfológica é importante para futuros estudos com o patógeno em questão, pois permite observar sua variação de comportamento perante condições favoráveis ou estressantes, como também sua fisiologia e capacidade de adaptabilidade ao meio natural. Partindo do ponto de conhecimento das características morfológicas do patógeno, a identificação de espécie a nível molecular é importante para a descrição completa dos isolados em estudo.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados apresentaram potencial antagônico contra os isolados de *Fusarium* spp. testados. Apesar de ser descrito na literatura a ação dos metabólitos voláteis do antagonista, não foi possível obter resultados satisfatórios para este princípio.

Como promotor de crescimento, fica evidente a ação do antagonista em relação ao aumento do desenvolvimento de parte aérea, raiz e comprimento de plântula, aumentando também a formação de raízes laterais.

Não foi observado efeito significativo para o tratamento de *Trichoderma* spp. *in vitro* que inibiu a germinação das sementes na maioria das concentrações testadas.

O isolado biológico na concentração de 2,5 conídios/mL⁻¹ apresentou efeito fitotóxico para as plântulas de feijão fava analisadas *in vivo* em casa de vegetação.

Os isolados de *Fusarium* spp. apresentaram uma ampla variabilidade de caracteres morfológicos analisados.

Algumas plantas de feijão fava analisadas no teste de transmissão apresentaram sintomas de necrose na raiz primária e escurecimento de feixe vascular, entretanto não foi possível observar a progressão destes sintomas. A observação mínima para progressão dos sintomas requer 21 dias de observação.

7. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. St. Louis, MO: Academic Press, 2005.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York: J. Wiley, 4.ed, 880 p, 1996.
- ALEXANDER, N.J.; MCCORMICK, P.S.; WAALWIJK, C.; VAN DER LEE, T.; PROCTOR, R.H. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology** v. 48, 485–495, 2011.
- ARMSTRONG, G.M.; ARMSTRONG, J. K. **Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases**. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUM, T. A.; COOK, R. J. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania: Pennsylvania State University, p. 391-399, 1981.
- ALVES-SANTOS, F. M.; CORDEIRO-RODRIGUES, L.; SAYAGUÉS, J. M.; MARTÍN-DOMINGUEZ, R.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.; ESLAVA, A. P. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**, v. 51, p. 605-611, Apr. 2002.
- ÁVILA, M.R.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; FAGLIARI, J.R.; SANTOS, J.L. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, nº 1, p.98-106, 2007.
- BHATTACHARYYA, P.N.; GOSWAMI, M.P.; BHATTACHARYYA, L.H.; Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. **Journal of Phytology**, v.8, 26-41, 2016.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**. ISBN: 978-85-85771-47-8, 2009.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, 7:249-260, 2004.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, [S.l.], v. 72, n. 4, p.379-382, 1982.
- BERLOFFA, J.M.; GRAICHEN, F.A.S.; FERNANDES, F.M.; SILVA, A.R.D. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de angico-vermelho sobre o crescimento inicial de plântulas. **Revista de Ciências Agroambientais**, v.13, n.2, p.78-86, 2015.

- BITOCCHI, E.; RAU, D.; BELLUCCI, E.; RODRIGUEZ, M.; MURGIA, M.L.; GIOIA, T.; SANTO, D.; NANNI, L.; ATTENE, G.; PAPA, R. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a Model for Understanding Crop Evolution. **Frontiers in Plant Science**, v.8, May, 2017.
- BORBA, M.C.; GARCÉS-FIALLOS, F.R.; STADNIK, M.J. Reactions of black bean seedlings and adult plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. **Crop Protection**, v. 96, 221-227, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.
- BRUNS, T. D.; FOGEL, R.; TAYLOR, J.W. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. **Mycologia**, v. 82: 175-184, 1990.
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* based on basidiome and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Edinburg, v.99, n.1, p.1-13, Jan. 1995.
- BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BACKHOUSE, D. et al. Biodiversity and population studies on *Fusarium*. In: LOGRIECO, A.; SEIFERT, K.A.; LESLIE, J.F.A. et al. **Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species**. *Sydowia*, Horn, v.30, p.1-11. 1997.
- BURUCHARA, R. A.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 39-45, Jan. 2000.
- CARRERAS-VILLASEÑOR, N.; SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J.A.; HERRERA-ESTRELLA, A.H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v. 158, 3–16, 2012.
- CARVALHO, D.D.C; MELLO, S.C.M; JÚNIOR, M.L. SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp.*phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, 1, 028-034, 2011.

CARVALHO, I.R.; SOUZA, V.Q.; FOLLMANN, D.N.; NARDINO, M.; SCHMIDT, D.; PELISSARI, G.; BARETTA, D. Desempenho fisiológico de cultivares de soja com regulação hídrica por Manitol. **Revista Agrarian**, v.9, n.31, p.34 - 43, Dourados, 2016.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.42, n.3, p.225-226, May. 1939.

CHAVES, P.P.N. **Qualidade de mudas de alface inoculadas com *Trichoderma* e reação de plantas adultas de alface a nematoides de galhas na presença de *Trichoderma***. Gurupi, 2015, 144 p, Dissertação. - Universidade Federal de Tocantins, Gurupi, 2015.

CHERHI, K.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 3, p. 457-471, 2015.

CHET, I.; HARMAN, G. E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**. v.7, 29–38, 1981.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. In *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 2 (eds Kubicek, C. P. & Harman, G. E.) 153–172, Taylor and Francis, London, 1998.

COSTA, I.F.D.; BALARDIN, R.S.; MEDEIROS, L.A.M.; LENZ, G.; GULART, C.A.; ZEMOLIN, C.R.; SILVA, T.M.B. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.47-50, 2009.

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; BELTRÁN-PEÑA, E.; HERRERA-ESTRELLA, A.; LÓPEZ-BUCIO, L. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. **Plant Signaling & Behavior**, v.6:10, 1554-1563, 2011.

CRONQUIST, A. Devolution and classification of flowering plants. New York: **New York Botanical Garden**, p.555, 1988.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. p. 414-430, 2012.

DELGADO – SALINAS, A; TURLEY, T.; RICHMAN, A.; LAVIN, M. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). **Systematic Botany**, v. 24, n.3, p. 438-460, 1999.

DELGADO-SALINAS, A.; BIBLER, R.; LAVIN, M. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. **Systematic Botany**. V.31, p.779–791, 2006.

DEBOUCK, D. G. **Notes sur Les Différents Taxons de *Phaseolus* à Partir des Herbiers-Section Paniculati**. Available online at: <http://www.ciat.cgiar.org/urg>, 233, 2008.

EKE, P.; CHATUE, G.C.; WAKAM, L.N.; KOUIPOU, R.M.T.; FOKOU, P.V.T.; BOYOM, F.F. Mycorrhiza consortia suppress the fusarium root rot (*Fusarium solani* f.sp. *Phaseoli*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, v.103, 240–250, 2016.

EMBABY, E. M.; REDA, M.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OMARA, H.; MOKABEL, A. M. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in some legume seeds. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 9, p. 151-164, 2013.

FARIA, A.Y.K.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; NETO, D.C. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 25, nº 1, p.121-127, 2003.

GLARE, T.; CARADUS, J. GELERNTER, W. Have biopesticides come of age. **Trends Biotechnol**, v.30, 250–8, 2012.

GOMES, R. L. F.; SOARES, C. A.; GÂNDARA, F. C.; BURLE, M. L. Aspects of crop and socioeconomic management of the Lima bean within Northeastern Brazil. In: FERREIRA, A. S. A.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F. (Org.). *Phaseolus lunatus*: Diversity, Growth and Production. New York: **Nova Science Publishers**, v. 1, p. 135-151, 2015.

GOMES, R.S.S.; NUNES, M.C.; NASCIMENTO, L.C.; SOUZA, J.O.; PORCINO, M.M. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.) **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.279-287, 2016.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. **Plant Disease**, v.84, 377–393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, v.2, p.43–56, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal: culturas permanentes**, 2016.

JANA, C.S.; MANDAL, M. Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates on *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, August, V.5 (4), 2017.

JUNIOR, G.M.B.; JUNIOR, A.F.C.; CHAGAS, L.F.B.; FILHO, M.R.C. MILLER, L.O.; SANTOS, G.R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis in vitro*. **Biota Amazônia**, 2017.

KARLSSON. I; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON. N.; DURLING, M.B.; KOLSETH, A.K.; STEINBERG. C.; PERSSON, P.; FRIBERG, H. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. **Applied and Environment Microbiology**, v.82, p.491–501, 2016.

LACERDA, R.R.; NASCIMENTO, E.S.; LACERDA, J.T.J.G.; PINTO, L.S.; RIZZI, C.; BEZERRA, M.M.; PINTO, I.R.; FILHO, S.M.P; PINTO, V.P.T.; FILHO, G.C.; GADELHA, C.A.A.; GADELHA, T.S. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. EUA: Blackwell Willey, 388 p, 2006.

LI, F.; CAO, D.; LIU, Y.; YANG, T.; WANG, G. Transcriptome Sequencing of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) to Identify Putative Positive Selection in *Phaseolus* and Legumes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p.15172-15187, 2015.

LIMA, C.S. **Caracterização biológica e molecular de espécies de *Fusarium* envolvidas na etiologia da malformação da mangueira**. UFLA, 2005. Tese, 111 p. Lavras, UFLA, 2006.

LIMA, M. L. P.; VAZ, M. C. A.; SILVA, A. S.; SOUZA, K. A.; TUÑON, G. I. L. *In vitro* confrontation of *Trichoderma* spp. isolates with phytopathogenic and non-phytopathogenic fungi. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 3, n. 2, p. 1–8, abr./jun. 2016.

- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.
- MACHADO NETO, N.B.; SATURNINO, S.M.; BOMFIM, D.C.; Water stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.4, p. 521-529, 2004.
- MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.L.B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.34, n.4, p.535-542, abr. 1999.
- MARTINS, G.L.M. Manejo de pragas agrícolas com fungos entomopatogênicos. **Agroline**, 2007.
- MARTINEZ-CASTILLO, J.; D. ZIZUMBO-VILLARREAL, H.; RIVERA, P.; MARÍN P.C.G. Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, Mexico. **Economic Botany**. v.58, p.354–380, 2004.
- MARTINEZ-CASTILLO, J.; D. ZIZUMBO-VILLARREAL, H.; RIVERA, P.; MARÍN P.C.G. Gene Flow and Genetic Structure in the Wild–Weedy–Domesticated Complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican Center of Domestication and Diversity. **Crop science**, vol. 47, 2007.
- MARASCO, R.; ROLLI, E.; ETTOUMI, B.; VIGANI, G.; MAPELLI, F.; BORIN, S. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. **PLoS One**, 2012.
- MATUO, T.; SNYDER, W.C. Use of morphology and mating populations in the identification of *formae speciales* in *Fusarium solani*. **Phytopathology**, v.63, p.562–565, doi:10.1094/Phyto-63-562, 1973.
- MILANESI, P.M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema de plantio**. Santa Maria, RS, 2009. 91 p. **Dissertação**, Santa Maria, RS, 2009.
- MIRANDA, B.A.; JÚNIOR, M.L.; CUNHA, M.G. Reação de cultivares do feijoeiro comum às podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* E *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.221-226, dez. 2007.
- MOREAU, J. S. **Germinação de sementes em diferentes substratos e caracterização morfológica de plântulas de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan**. 2011. 45 f. Monografia. - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2011.

MOTA, J.M.; MELO, M.P.; SILVA, F.F.S.; SOUSA, E.M.J; SOUSA, E.S.; BARGUIL, B.M.; BESERRA, J.E.A. Fungal diversity in lima bean seeds. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v.11; (1), p.79-87, 2017.

MULLIGAN, M.F.; SAFIR, G.S.; KLOMPARENS, K.L. Association of *Fusarium solani* f. sp. *phaseolus* with trichomes of *Phaseolus vulgaris*. **Mycological Research**, v.94, p.409-411, 1990.

MUNIZZI, A. et al. Qualidade de sementes de quatro cultivares de soja, colhidas em dois locais no estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.176-185, 2010.

NASCIMENTO, L.C.; MEDEIROS, J.G.F. **Patologia das sementes: noções básicas**. João Pessoa: Editora da UFPB, 2015. 196p.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, May/June 1998.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium species: an illustrated manual for identification***. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 226 p.

O'DONNELL, K. Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. **Sydowia** v.48, p.57–70, 1996.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7, Issue 1, Feb, p. 103-116, 1997.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H.I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Tokyo, v.41, n.1, p.61-78, 2000.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*- *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v.92, p.919–938, 2000.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M.G.; BRANDT, M.E.; ZHANG, N.; GEISER, D.M. Molecular phylogenetic diversity; multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2477–2490, 2008.

O'DONNELL, K.; GUEIDAN, C.; SINK, S.; JOHNSTON, P.; CROUS, P.; GLENN, A. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetic Biology**. V.46, p.936–948, 2009.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Lavras, MG. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1991.

PATEKOSKI, K.S.; ZOTTARELLI, C. L.A.P.; Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* e na promoção de crescimento de alface hidropônica. Centro Universitário Adventista de São Paulo – Unasp, **Acta Scientia Biologica**. v. 1, n. 1, p. 59-74 2016.

PARSA, S.; GARCIA-LEMONS, A. M.; CASTILLO, K.; ORTIZ, V.; LOPEZ-LAVALLE, L. A. B.; JEROME, F. B. V. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Fungal Biology**, v. 120, p. 783-790, 2016.

PENHA, J.S. **Determinação da taxa de fecundação cruzada natural e diversidade genética em feijão-fava por marcadores microssatélites**. 2014. 36p. Dissertação (Mestrado - Genética e Melhoramento). - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.

PEREIRA, M.J.Z. **Resistência do feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli***. - Lavras: UFLA, 2007, 103p. Tese, Universidade Federal de Lavras, 2007.

PÉREZ-SIERRA, A.; LANDERAS, E.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. **Mycological Research**, v.111, ed. 7, p. 832-839, 2007.

PÉREZ, S.A.; LANDERAS, E.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; GARCÍA, J.J.; ARMENGOL, J. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. **Mycological Research**, v.111, Issue 7, July. P.832-839, 2007.

PIZZETA, M. **Caracterização de *Fusarium decemcellulare*, *F. oxysporum* e *F. incarnatum* em seringueira no estado de São Paulo, resistência clonal e sensibilidade a fungicidas**. - Botocatu, 2017. 111p Tese, Botocatu, 2017.

PFENNING, L.H.; COSTA, S. S.; MELO, M. P.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. First report and characterization of *Fusarium circinatum*,

the causal agent of pitch canker in Brazil. **Tropical plant pathology**. vol.39, n.3, p.210-216, 2014.

QUERALES, P.J. **Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo do milho (*Zea mays* L.).** - Piracicaba, 2010. 81p. Tese, Piracicaba, 2010.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Prodcuts**, v. 62, p. 250-264, 2014.

REDDA, E.T.; MA, J.; MEI, J.; LI, M.; WU, B.; JIANG, X. Biological control of soilborne pathogens (*Fusarium oxysporum* f.sp. cucumerinum) of Cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp. **Journal of Life Sciences**, v.12, p 1-12, 2018.

REDDY, G.V.P.; ZHAO, Z.; HUMBER, R.A. Laboratory and field efficacy of entomopathogenic fungi for the management of the sweetpotato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.122, p.10–15, 2014.

RODRIGUES, G.S.; MAGALHÃES, D.M.A.; COSTA, A.M.; LUZ, E.D.M.N. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de Ceratocystis em cacauero. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p.72-78, 2018.

SABA, H.; VIBHASH, D.; MANISHA, M.; PRASHANT, K.S.; FARHAN, H.; TAUSEEF A. *Trichoderma* - A promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, v.3, p. 524-31, 2012.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Plant physiology. 4.ed. Belmont: **Wadsworth Publishing Company**, 1992. 682p.

SANTIN, R.C.M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Parcilymyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*.** - Porto Alegre, 2008. 91p. Tese, Porto Alegre, 2008.

SANTOS, J. O. **Divergência genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.).** – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008. 97 p. Dissertação, Teresina, 2008.

SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J.E.M.F.; WANDERLEY JÚNIOR, J.S.A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no estado da Paraíba. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p.1407-1412, 2002.

SARI, L.T.; COSTA, C.S.R.; PEREIRA, P.R.V.S. Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L., cv.

Carioca (Fabaceae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia** v.47(4), p.621-624, 2003.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v.100, p.923–935, 1996.

SCHALCHLI, H.;TORTELLA, G.R.; RUBILAR, O.; PARRA, L.; HORMAZABAL, E; QUIROZ, A. Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. **Critical reviews in Biotechnology**, v.36 (1), p.144-52, 2016.

SILVA-FLÁVIO, N. S. D. S.; et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 7-20, 2014.

SOUZA, E.P.; PERINO, F.H.B.; MOSCATO, B.S.; FREITAS, P.G.N.; BLUMER, S.; CARDOSO, A.I.I.; BONINI, C.S.B.; NETO, A.B. Extrato de própolis no controle do *Penicillium* sp. e na qualidade de sementes de couve-flor. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11(2): 135-141, 2017.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006, 217 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Jaboticabal, 2006.

SOUSA, E.S. **Novos agentes etiológicos de doenças do feijão-fava no Brasil**. – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016, 77 p. Dissertação, Teresina, 2016.

SREEVIDYA, M.; GOPALAKRISHNAN, S.; MELØ, T.M.; SIMIC, N.; BRUHEIM, P; SHARMAA, M.; SRINIVAS, V.; ALEKHYA, G. Biological control of Botrytis cinerea and plant growth-promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.), **Biocontrol Science and Technology**, 2015.

SUMMERELL, B; SALLEH, B; LESLIE, J. A Utilitarian Approach to Fusarium Identification. **Plant Disease**, v.87, p.117-128, 2003.

SUMMERELL, B.A., LAURENCE, M.H., LIEW, E.C.Y. et al. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, v.44, p.3, 2010.

SWETT, C.L.; GORDON, T.R. First report of grass species (*Poaceae*) as naturally occurring host of the pine pathogen *Gibberella circinata*. **Plant Disease**, v.96, p.908, 2012.

TJAMOS, E.C.; PAPAVIDAS, G.C.; COOK, R.J. Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. **Plenum Press**, New York, 1992.

TU, J.C. Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the *Fusarium* root rot complex of pea in southwestern Ontario. **Phytoprotection**, v.75, p.125-131, 1994.

VAZ PATTO, M. C., AMAROWICZ, R., ARYEE, A. N., BOYE, J. I., CHUNG, H. J., MARTÍN- CABREJAS, M. A., et al. Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. **Critical Reviews in Plant Science**. V.34, p. 105–143, 2015.

VELOSO, J.S. **Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi**. – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013, 49p. Dissertação, Recife, 2013.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOOA, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, 2008.

XUE, R.; WU, J.; ZHU, Z.; WANG, L.; WANG, X.; WANG, S.; BLAIR, M.W. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **PLoS One** **10**, 2015.

ZHAI, M.M.; QI, F.M.; LI, J.; JIANG, C.X.; HOU, Y.; SHI, Y.P.; DI, D.L.; ZHANG, J.W.; WU, Q.X. Isolation of Secondary Metabolites from the Soil-Derived Fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a Biological Control Agent, and Evaluation of Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A.; K., KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil**, v.235, p.235–242, 2001.

ZIMMERMANN, M. J. de O.; TEIXEIRA, M. G. Origem e evolução. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (Coord.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: **Potafos**, p. 57-70, 1996.

ZIVKOVIC, S.; STOJANOVIC, S.; IVANOVIC, Z.; GAVRILOVIC, V.; POPOVIC, T.; BALAZ, J. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Archive of Biological Science**, Belgrade, 2010.